

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Monkeypox virus

RUO

For Research Use Only (RUO)

This product has no declared clinical intended purpose and is not for clinical diagnostic use. No claim or representation is intended to provide information for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

Este producto no tiene un propósito clínico declarado y no es para uso en diagnóstico clínico. No existe la pretensión o representación de proporcionar información para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad.

These instructions for use apply to the following references / Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 1 x 8-well strips, low profile	VS-MPX101LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 1 x 8-well strips, high profile	VS-MPX101HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 6 x 8-well strips, low profile	VS-MPX106LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 6 x 8-well strips, high profile	VS-MPX106HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 12 x 8-well strips, low profile	VS-MPX112LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 12 x 8-well strips, high profile	VS-MPX112HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 96-well plate, low profile	VS-MPX113LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 96-well plate, high profile	VS-MPX113HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX101RUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX136RUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX172RUO

Table A 1. References for Open format with internal control products. / Referencias para productos Open Format con control interno.

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 2) / FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO, 4 tubes x 24 reactions	VS-MPX196TRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO, 2 tubes x 24 reactions	VS-MPX148TRUO

Table A 2. References for Tube format with internal control products. / Referencias para productos formato Tubo con control interno.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Las instrucciones de uso (IFU) se incluyen en el kit en versión inglés/español.

EN For download IFUS from other languages, please enter in **certest.es/viasure/labeling**. Once you be there, please following the instructions for access to the language that you need. If you need additional information, please contact: viasure@certest.es.

ES Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en **certest.es/viasure/labeling**. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: viasure@certest.es.

RO Pentru a descărca IFUS în alte limbi, vă rugăm să accesați **certest.es/viasure/labeling**. Accesat site-ul, urmați instrucțiunile pentru a selecta limba necesară. Pentru informații suplimentare, contactați: viasure@certest.es.

FR Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur **certest.es/viasure/labeling**. Une fois sur place, suivez les instructions pour accéder à la langue dont vous avez besoin. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: viasure@certest.es.

DE Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu **certest.es/viasure/labeling**. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: viasure@certest.es.

IT Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su **certest.es/viasure/labeling**. Una volta che sei lì, segui le istruzioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: viasure@certest.es.

PT Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse **certest.es/viasure/labeling**. Uma vez lá, siga as instruções para acessar o idioma que você precisa. Se você precisar de informações adicionais, entre em contato: viasure@certest.es.

NE Om de IFUS in andere talen te downloaden, gaat u naar **certest.es/viasure/labeling**. Als je daar bent, volg je de instructies om toegang te krijgen tot de taal die je nodig hebt. Neem voor meer informatie contact op met: viasure@certest.es.

Note: The user should notify the manufacturer and the competent authority of the Member State in which he is established as a user and/or patient of any serious incident related to the product.

Nota: El usuario debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido como usuario y/o paciente cualquier incidencia grave relacionada con el producto

Content

1.	Intended use.....	6
2.	Summary and Explanation	6
3.	Principle of the procedure	7
4.	Reagents provided	7
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	7
6.	Transport and storage conditions.....	8
7.	Precautions for users	8
8.	Test procedure	9
8.1.	Specimen collection, transport and storage	9
8.2.	DNA extraction	9
9.	Result interpretation	10
10.	Limitations of the test	11
11.	Quality control.....	12
	ANNEX 1	13
A1.1	Principle of the procedure.....	13
A1.2	Reagents provided.....	13
A1.3	Test procedure	15
A1.3.1	Lyophilized positive control.....	15
A1.3.2	PCR protocol.....	15
	ANNEX 2	16
A2.1	Principle of the procedure.....	16
A2.2	Reagents provided.....	16
A2.3	Test procedure	17
A2.3.1	Lyophilized positive control.....	17
A2.3.2	Lyophilized reaction mix tube.....	17
A2.3.3	PCR protocol.....	17

Contenido

1.	Uso previsto	19
2.	Introducción y explicación	19
3.	Procedimiento	20
4.	Reactivos suministrados.....	20
5.	Material requerido y no suministrado	20
6.	Condiciones de transporte y almacenamiento	21
7.	Precauciones para el usuario	21
8.	Procedimiento del test	23
8.1.	Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	23
8.2.	Extracción de DNA	23
9.	Interpretación de resultados.....	23
10.	Limitaciones del test	25
11.	Control de calidad	26
	ANEXO 1	27
A1.1	Procedimiento	27
A1.2	Reactivos suministrados	27
A1.3	Procedimiento del test	29
A1.3.1	Control positivo liofilizado	29
A1.3.2	Protocolo PCR	29
	ANEXO 2.....	30
A2.1	Procedimiento	30
A2.2	Reactivos suministrados	30
A2.3	Procedimiento del test	31
A2.3.1	Control positivo liofilizado	31
A2.3.2	Mezcla de reacción liofilizada	31
A2.3.3	Protocolo PCR	31
	Symbols for components and reagents/Símbolos para reactivos y productos	33
	Trademarks.....	33

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit is a real-time PCR test designed for the qualitative identification of DNA from Monkeypox virus in clinical samples from individuals suspected of Monkeypox virus infection by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used for research purposes, without any medical objective is not regarded as devices for performance evaluation. DNA is extracted from clinical specimens, amplified using real-time PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Monkeypox virus.

2. Summary and Explanation

Monkeypox virus (MPXV) is an enveloped double-stranded DNA virus. It belongs to the *Orthopoxvirus* genus of the *Poxviridae* family. The *Orthopoxvirus* genus also includes Vaccinia virus, Cowpox virus, Variola virus and several other, animal-related, poxviruses. Two phylogenetically distinct clades of MPXV have been identified through genomic sequencing: the Central African (Congo Basin) clade and the West African clade. Typically, the Central African MPXV is associated with more severe disease, higher mortality, and more frequent human-to-human transmission.

MPXV is transmitted to humans through contact with an infected animal or human, or with material contaminated with the virus. The virus enters the body through broken skin, the respiratory tract or the mucous membranes. The incubation period of monkeypox is usually from 6 to 13 days but can range from 5 to 21 days. Virus transmission through direct or indirect contact with live or dead animals is assumed to be the main factor for human MPX infections. This may occur by bite or scratch, bush meat preparation, direct contact with body fluids or lesions from an infected animal or contaminated material (indirect contact). Eating inadequately cooked meat of an infected animal is an additional possible risk factor. Similar to smallpox, human-to-human transmission of MPXV occurs mostly through large respiratory droplets during direct and prolonged face-to-face contact. In addition, MPXV can be transmitted by direct contact with body fluids of an infected person or with contaminated objects, such as bedding or clothing.

Human monkeypox often begins with a combination of the following symptoms: fever, headache, chills, exhaustion, asthenia, lymph node swelling, back pain and muscle aches. Commonly, within one to three days after onset of fever, the patient develops a rash, which tends to first appear on the face and then spreads to other parts of the body, including hands and feet. The cutaneous lesions often first present as macules, evolving successively to papules, vesicles, pustules, crusts and scabs. The main difference between smallpox and MPX is that MPXV causes lymphadenopathy (e.g. in the cervical or inguinal region) while smallpox virus and chickenpox virus usually do not. The study of Immune markers has provided evidence of asymptomatic MPX infections in individuals vaccinated against smallpox and others that had not been vaccinated. For most people, MPX is a self-limited disease, typically lasting two to four weeks and resulting in complete recovery.

The key objectives of surveillance and case investigation for monkeypox in the current context are to rapidly identify cases, clusters, and the sources of infection as soon as possible in order to provide optimal clinical care, isolate cases to prevent further transmission, identify and manage contacts and tailor effective control and prevention

methods based on most commonly identified routes of transmission; in this sense, Polymerase chain reaction (PCR) is the preferred laboratory test given its accuracy and sensitivity.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit is designed for the identification of Monkeypox virus in clinical samples. After DNA isolation, the detection of Monkeypox virus is performed by the amplification of a conserved region of *G2R* and *F3L* genes for Monkeypox virus using specific primers and fluorescent-labelled probes.

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an **endogenous internal control** to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an **endogenous internal control (EIC)** (hemoglobin subunit beta gene, *HBB* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

4. Reagents provided

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open and rotor-gene format with internal control products and Annex 2 for tube format with internal control products.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tubes format (Annex 2).
- DNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments). Only for Rotor Gene format (Annex 1).

To check thermocycler compatibility and most common detection channels consult website www.certest.es.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from light.
- For Tube format kits: Once the *Monkeypox virus* Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept it at 25°C±5°C or 2°C to 8°C for up to 4 hours. For a longer period of time, it is recommended store at -20°C and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times).

7. Precautions for users

- This VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit is for Research Use Only
- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR and diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and Nucleic acid extraction system).
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for references: VS-MPX113LRUO, VS-MPX113HRUO, VS-MPX136RUO and VS-MPX172RUO). Remove any excess air in the pouches prior to closing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-MPX101RUO, VS-MPX136RUO and VS-MPX172RUO (compatible for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipment required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease

(RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.

- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles, and mask. Do not eat, drink, or smoke in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP) or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions, and procedures.

8. Test procedure

Please see Annex 1 for Open and Rotor-Gene format with endogenous internal control products Test Procedure and Annex 2 for Tube format with endogenous internal control products Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit has been designed to test clinical samples.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

For DNA extraction from respiratory samples, you can use your manual or automatic routine optimized system, or any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions

9. Result interpretation

All the result of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Endogenous Internal Control (EIC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. Use the Positive Control amplification curve as a starting point during the run validation (before than interpretation of patient sample results), in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal in the positive control well.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Controls	Monkeypox virus (FAM) ¹	Endogenous Internal Control (EIC) (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	>40 or no signal*	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls

* It is possible that non-specific amplifications in late Ct values (Ct>35) may appear due to human manipulation of the process, since human HBB gene is a human housekeeping gene and is expected to be present in all nucleated human cells.

1 In cases where either or both of the control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for any target channel), all results are reported as 'Invalid' and retesting is required.

2 The positive template control includes human housekeeping HBB gene target; therefore, amplification signals are observed in all target channels, including the Endogenous Internal Control (EIC).

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

For interpretation of individual patient sample results, use the following table, read, and analyze the results:

Monkeypox virus (FAM)	Endogenous Internal Control (EIC) (HEX)	Interpretation for patient's individual samples	
≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	Monkeypox virus DNA Detected
>40 or no signal	≤35 ²	Valid	Targets not Detected ²
>40 or no signal	>35 or no signal ²	Invalid	Test Failure – Repeat Testing ²

Table 2. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curves.

1 The Endogenous Internal Control (EIC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 In the case of Monkeypox virus target sites negative, EIC must show an amplification signal with Ct ≤35. The Ct value could be very variable due to the endogenous internal control is a human housekeeping gene that should be present in all human nucleated cells in the original samples. If there is an absence of signal or Ct value > 35 of the endogenous internal control, the result is considered as 'invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use; the extraction process used by the user; to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or
- re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- obtain a new specimen and retest.

10. Limitations of the test

- The test must be used for RUO purposes (Exclusive Use in Research), without any medical objective.
- The quality of the test depends on the quality of the sample: nucleic acid must be properly extracted from clinical samples.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Monkeypox virus, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Degradation of the viral DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown Monkeypox virus variants.
 - A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics, or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.

If in doubt, refer to section 9 to check the correct interpretation of the results.

- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable virus and does not imply that these viruses are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets virus sequences.
- Negative results do not preclude Monkeypox virus infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak viral levels during infections caused by Monkeypox virus have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the pathogen.
- If diagnostic tests for other diseases are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that Monkeypox virus infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment, extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.
- Some samples may fail to exhibit *HBB* amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative IC signal does not preclude the presence of Monkeypox virus in a clinical specimen.

11. Quality control

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the endogenous internal control (EIC) in each well confirms the correct performance of the technique.

ANNEX 1

OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 1 x 8-well strips, low profile	VS-MPX101LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 1 x 8-well strips, high profile	VS-MPX101HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 6 x 8-well strips, low profile	VS-MPX106LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 6 x 8-well strips, high profile	VS-MPX106HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 12 x 8-well strips, low profile	VS-MPX112LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 12 x 8-well strips, high profile	VS-MPX112HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 96-well plate, low profile	VS-MPX113LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 96-well plate, high profile	VS-MPX113HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX101RUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX136RUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX172RUO

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an Endogenous Internal Control (EIC) (hemoglobin subunit beta gene, *HBB* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

Target	Channel	Gene
Monkeypox virus	FAM	G2R and F3L genes
Endogenous Internal control (EIC)	HEX	HBB gene (β-globin)

Table A1 2. Target, channel and genes.

A1.2 Reagents provided

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.3, A1.4 and A1.5. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A1.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A1.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices. Table A1.5 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Monkeypox virus</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	White	1/6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	1/6/12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MPX01LRUO, VS-MPX101HRUO, VS-MPX106LRUO, VS-MPX106HRUO, VS-MPX112LRUO and VS-MPX112HRUO.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Monkeypox virus</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-MPX113LRUO and VS-MPX113HRUO.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Monkeypox virus</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	Transparent	2/9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	2/9/18 x 4-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MPX101RUO, VS-MPX136RUO and VS-MPX172RUO. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Lyophilized positive control

Monkeypox virus Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Monkeypox virus* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A1.3.2 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *Monkeypox virus* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Initial denaturation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A1 5. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Monkeypox virus*) and HEX (Endogenous Internal Control (EIC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 2

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO, 4 tubes x 24 reactions	VS-MPX196TRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO, 2 tubes x 24 reactions	VS-MPX148TRUO

Table A2. 1. References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPS, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an Endogenous Internal Control (EIC) (hemoglobin subunit beta gene, *HBB* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

Target	Channel	Gene
Monkeypox virus	FAM	G2R and F3L genes
Endogenous Internal control (EIC)	HEX	<i>HBB</i> gene (β-globin)

Table A2. 2. Target, channel and genes. *Depending on the equipment used select the proper detection channel, channel, to check most common detection channels consult website www.ceratest.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3 and A2.4.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Monkeypox virus Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	White	4 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Monkeypox virus Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table A2. 3. Reagents and materials provided in VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MPX196TRUO.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Monkeypox virus</i> Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	White	2 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table A2. 4. Reagents and materials provided in VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MPX148TRUO.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

Monkeypox virus Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Monkeypox virus* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *Monkeypox virus* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A2.3.3 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *Monkeypox virus* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *Monkeypox virus* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the tubes with caps or seal the plate. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips, or tube in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Initial denaturation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A2. 5. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Monkeypox virus*) and HEX (Endogenous Internal Control (EIC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit es una prueba de PCR en tiempo real diseñada para la identificación cualitativa de DNA del virus de la viruela del mono en muestras clínicas de personas sospechosas de infección por el virus de la viruela del mono por su profesional de la salud. El uso previsto del test es con fines de investigación, sin ningún objetivo médico, no se consideran dispositivos para la evaluación del rendimiento. El DNA es extraído de muestras clínicas, y posteriormente amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con una molécula fluorescente y otra apantalladora (quencher) para detectar virus de la viruela del mono.

2. Introducción y explicación

El virus de la viruela del mono (MPXV) es un virus de DNA envuelto de doble cadena. Pertenece al género *Orthopoxvirus* de la familia *Poxviridae* que también incluye otros virus como el virus *Vaccinia* (o virus Vacuna), el virus *Cowpox* (virus de la viruela bovina), el virus *Variola* y otros poxvirus varios relacionados con animales. Se han identificado dos clados filogenéticamente distintos de MPXV mediante secuenciación genómica: el clado de África Central (Cuenca del Congo) y el clado de África Occidental. Por lo general, el MPXV de África Central se asocia con una enfermedad más grave, una mayor mortalidad y una transmisión de persona a persona más frecuente.

El MPXV se transmite a los humanos a través del contacto con un animal o humano infectado, o con material contaminado con el virus. El virus se introduce en el cuerpo a través de heridas en la piel, el tracto respiratorio o las membranas mucosas. El período de incubación de la viruela del mono suele ser de 6 a 13 días, aunque puede oscilar entre 5 y 21 días. Se supone que la transmisión del virus a través del contacto directo o indirecto con animales vivos o muertos es el factor principal de las infecciones humanas por MPXV. Esta transmisión puede ocurrir por mordedura o arañazo, mala preparación de la carne de monte, contacto directo con fluidos corporales o lesiones de un animal infectado o material contaminado (contacto indirecto), así como comer carne mal cocinada de un animal infectado.

De manera similar a la viruela, la transmisión del MPXV de persona a persona ocurre principalmente a través de gotitas respiratorias grandes durante el contacto cara a cara directo y prolongado. Además, el MPXV puede transmitirse por contacto directo con fluidos corporales de una persona infectada o con objetos contaminados, como ropa de cama o prendas de vestir.

La viruela del mono humano a menudo comienza con una combinación de los siguientes síntomas: fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, agotamiento, astenia, inflamación de los ganglios linfáticos, dolor de espalda y dolores musculares. Comúnmente, de uno a tres días después del inicio de la fiebre, el paciente desarrolla una erupción, que tiende a aparecer primero en la cara y luego se extiende a otras partes del cuerpo, incluidas las manos y los pies. Las lesiones cutáneas a menudo se presentan primero como máculas, evolucionando sucesivamente a pápulas, vesículas, pústulas y costras. La principal diferencia entre la viruela y el MPXV es que el MPXV causa linfadenopatía (por ejemplo, en la región cervical o inguinal), mientras que el virus de la viruela y el virus de la varicela generalmente no lo hacen. En algunos casos, el estudio de marcadores inmunológicos ha dado lugar a

evidencias de infección por MPXV asintomática tanto en individuos vacunados contra la viruela como en otros que no habían sido vacunados.

Para la mayoría de las personas, MPXV es una enfermedad autolimitada, que generalmente dura de dos a cuatro semanas y da como resultado una recuperación completa.

Los objetivos clave de la vigilancia y la investigación de casos de viruela del mono en el contexto actual son identificar rápidamente los casos, los grupos y las fuentes de infección lo antes posible para brindar una atención clínica óptima, aislar los casos para evitar una mayor transmisión, identificar y gestionar los contactos, y adaptar métodos efectivos de control y prevención basados en las rutas de transmisión más comúnmente identificadas; en este sentido. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la prueba de laboratorio preferida dada su precisión y sensibilidad.

3. Procedimiento

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación de *Monkeypox virus* en muestras clínicas. Después del aislamiento del DNA, la detección del virus de la viruela del mono se realiza mediante la amplificación de una región conservada de los genes *G2R* y *F3L*, utilizando oligonucleóticos específicos y una sonda marcada con fluorescencia.

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit utiliza la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de RNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPS, tampón y polimerasa) en formato estabilizado, así como un **Control Interno Endógeno** para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza el gen humano *housekeeping* como **Control Interno Endógeno (CIE)** (el gen *HBB*, codificante para la subunidad beta de la hemoglobina). Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit incluye los materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para "open y rotor-gene format" y el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control endógeno interno.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo, tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2).

- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 μL , 20-200 μL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®). Solo para formato Rotor Gene (Anexos 1 y 3).

Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.
- Para kits en formato tubo: Una vez el vial *Monkeypox virus* Reaction-Mix ha sido reconstituido puede mantenerse a 25°C $\pm$ 5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

7. Precauciones para el usuario

- El kit VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit es solo para uso en investigación.
- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después

de cada uso (para referencias: VS-MPX113LRUO, VS-MPX113HRUO, VS-MPX136RUO y VS-MPX172RUO). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.

- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para VS-MPX101RUO, VS-MPX136RUO y VS-MPX172RUO (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad debido a que se clasifican como no peligroso para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (CLP) o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para open format Y Rotor -Gene con productos con control interno endógeno y el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno endógeno.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection kit ha sido diseñado para testarse en muestras clínicas.

Las muestras clínicas deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte la guía CDC (Specimen collection guidelines. Sitio web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) y la guía IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94) y García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de DNA a partir de muestras respiratorias, puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático o cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante.

9. Interpretación de resultados

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Verifique la señal de control interno (CIE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. Utilizar la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la ejecución (antes de la interpretación de los resultados de la muestra del paciente), para asegurarse de que los umbrales caen dentro de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a diferentes intensidades de señal.

El uso de controles positivos y negativos en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal en el pocillo de control positivo.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	Monkeypox virus (FAM) ¹	Control Interno Endógeno (CIE) (HEX) ²	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	>40 o no señal*	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles.

* Es posible que aparezcan amplificaciones no específicas en valores tardíos de Ct (Ct>35) debido a la manipulación humana del proceso, ya que el gen HBB es un gen humano housekeeping y se espera que esté presente en todas las células humanas nucleadas.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "no válidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El control positivo incluye la diana del gen housekeeping HBB presente en el DNA humano; por lo tanto, se observan señales de amplificación en todos los canales, incluido en el Control Interno Endógeno (CIE).

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, use la siguiente tabla:

Monkeypox virus (FAM)	Control Interno Endógeno (CIE) (HEX)	Interpretación para muestras de pacientes	
≤40	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de Monkeypox virus detectado.
>40 o sin señal	≤ 35 ²	Válido	Dianas no detectadas²
>40 o sin señal	>35 o sin señal ²	No válido	Test Fallido – Repita el test ²

Tabla 2. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores. sin señal = sin curva de amplificación.

1 El control interno endógeno (CIE) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

2 En el caso de que las regiones diana de Monkeypox virus resulten negativas, el CIE debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. El valor de Ct podría ser muy variable debido a que el control interno endógeno es un gen humano housekeeping que debería estar presente en todas las células nucleadas humanas en la muestra original. En el caso de ausencia de señal o de valor de Ct > 35 del control interno endógeno, el resultado se considera "no válido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- Repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada, o
- Volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

10. Limitaciones del test

- La prueba debe usarse con fines RUO (uso exclusivo en investigación), sin ningún objetivo médico.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con Monkeypox virus ya sea a causa de muestras con una elevada concentración de DNA diana o por contaminación a causa de productos de la PCR de reacciones previas.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA viral durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de Monkeypox virus.
 - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.

En caso de duda, consulte la sección 9 para comprobar la interpretación correcta de los resultados.

- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de virus viables y no implica que estos virus sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias virales diana.
- Resultados negativos no excluyen padecer infección por Monkeypox virus, y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga viral durante las infecciones causadas por Monkeypox virus. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el/ los virus.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por Monkeypox virus, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado, sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.
- Algunas muestras pueden no presentar curvas de amplificación de *HBB* debido al bajo número de células humanas en la muestra clínica original. Una señal del CIE negativa no impide la presencia de DNA de Monkeypox virus en una muestra clínica.

11. Control de calidad

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno endógeno (CIE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

ANEXO 1

OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 1 x 8-well strips, low profile	VS-MPX101LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 1 x 8-well strips, high profile	VS-MPX101HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 6 x 8-well strips, low profile	VS-MPX106LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 6 x 8-well strips, high profile	VS-MPX106HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 12 x 8-well strips, low profile	VS-MPX112LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 12 x 8-well strips, high profile	VS-MPX112HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 96-well plate, low profile	VS-MPX113LRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 96-well plate, high profile	VS-MPX113HRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX101RUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX136RUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX172RUO

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como control Interno Endógeno (CIE) (el gen *HBB*, codificante para la subunidad beta de la hemoglobina presente en el DNA humano). Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

Diana	Canal	Gen
Monkeypox virus	FAM	genes G2R y F3L
Control Interno Endógeno (CIE)	HEX	<i>HBB</i> gene (β-globin)

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3, A1.4 y A1.5. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A1.5 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cerTEST.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Monkeypox virus</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno endógeno en formato estabilizado	Blanco	1/6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MPX01LRUO, VS-MPX101HRUO, VS-MPX106LRUO, VS-MPX106HRUO, VS-MPX112LRUO y VS-MPX112HRUO.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Monkeypox virus</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno endógeno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MPX113LRUO y VS-MPX113HRUO.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Monkeypox virus</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno endógeno en formato estabilizado	Transparente	2/9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A1 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MPX101RUO, VS-MPX136RUO y VS-MPX172RUO. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0,1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Monkeypox virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Monkeypox virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A1.3.2 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Monkeypox virus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A1. 6. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Monkeypox virus*) y HEX (Control Interno Endógeno (CIE)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO, 4 tubes x 24 reactions	VS-MPX196TRUO
VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Reagents RUO, 2 tubes x 24 reactions	VS-MPX148TRUO

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como control Interno Endógeno (CIE) (el gen *HBB*, codificante para la subunidad beta de la hemoglobina presente en el DNA humano). Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

Diana	Canal	Gen
Monkeypox virus	FAM	genes G2R y F3L
Control Interno Endógeno (CIE)	HEX	<i>HBB</i> gene (β-globin)

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes. * seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3 y en la Tabla A2.4.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Monkeypox virus Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno endógeno en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Monkeypox virus Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MPX196TRUO.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Monkeypox virus Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno endógeno en formato estabilizado	Blanco	2 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Monkeypox virus Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MPX148TRUO.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de Monkeypox virus Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir Monkeypox virus Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción de Monkeypox virus (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A2.3.3 Protocolo PCR

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL de Monkeypox virus Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Monkeypox virus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A2. 5. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Monkeypox virus) y HEX (Control Interno Endógeno (CIE)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

Bibliography/Bibliografía

1. Yu Li *et al.* Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. *Journal of Virological Methods*, 2010.169 (2010) 223–227.
2. Rinat A. Maksyutov *et al.* Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 2106.236 (2016) 215–220.
3. Li D *et al.* Evaluation of the GeneXpert for Human Monkeypox Diagnosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017 Feb 8;96(2):405-410.
4. Shchelkunov SN *et al.* Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods*. 2011 Aug;175(2):163-9.
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/monkeypox/factsheet-health-professionals> Accessed May 2022.
6. World Health Organization. Monkeypox. Available from https://www.who.int/health-topics/monkeypox#tab=tab_1. Accessed May 2022.

Symbols for components and reagents/Símbolos para reactivos y productos

	Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Unique Device Identification Identificación única de dispositivo
							Catalogue number Número de referencia

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Control de Cambios / Change Control		
Versión / Version nº	Cambios / Changes	Fecha / Date
00	Versión Original / Original Version	25/05/2022
01	Corrección de texto / Typo correction	15/06/2022

Table A 3. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 15th June 2022

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead

F-566 rev02