

Vitassay qPCR

MonkeyPox

PCR en tiempo real para la detección cualitativa de DNA del virus de la viruela del mono en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection of MonkeyPox virus DNA in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR MonkeyPox permite la detección cualitativa de DNA del virus de la viruela del mono mediante PCR en tiempo real en muestras clínicas procedentes de pacientes con sospecha de infección por este virus. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones causadas por el virus de la viruela del mono, junto con los datos clínicos del paciente, factores de riesgo epidemiológico y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR MonkeyPox 4x8-well strip, low profile	7041080
Vitassay qPCR MonkeyPox 4x8-well strip, high profile	7042080

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S080/ 7042S080	MonkeyPox strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C080	MonkeyPox Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o ≤ -70°C).
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex

- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

El virus de la viruela del mono humana o viruela símica, MPXV, es uno de los cuatro virus del género *Orthopoxvirus* de la familia *Poxviridae*, con capacidad infectiva en humanos. Los otros tres son el virus causante de la viruela (VARV, o virus *variola major*), el virus *variola minor* y el virus de la viruela de las vacas. Este virus zoonótico de ADN de doble cadena no fue reconocido como una infección distinta en los seres humanos hasta la década de 1970, cuando se aisló el virus de un paciente de 9 meses con sospecha de viruela en la República Democrática del Congo.

La mayoría de las manifestaciones clínicas causadas por la infección por el virus *Monkeypox* son indistinguibles de las de la viruela. Antes de la aparición de los síntomas, hay un periodo de incubación que suele durar de 7 a 14 días. Después, hay un pródromo febril inicial que se acompaña de cefalea y fatiga generalizadas. La sintomatología suele evolucionar hacia una linfadenopatía maxilar, cervical o inguinal en muchos pacientes, antes de que se desarrolle una erupción típica a los 1-3 días tras la aparición de la fiebre. La erupción evoluciona a máculas, pápulas, vesículas, pústulas y costras antes de caer. Los síntomas suelen durar de 2 a 4 semanas. Se considera que tiene una tasa de letalidad de entre el 1 y el 10%, siendo mayor en los niños.

Desde la primera descripción en humanos en 1970, la viruela símica se ha reportado en 11 países africanos, y se han experimentado diferentes brotes a nivel global. Especialmente en Nigeria, donde desde 2017 se han registrado más de 500 casos sospechosos y 200 confirmados (OMS).

Se trata de una enfermedad preocupante en lo referente a la salud pública mundial. En 2003, el primer brote de viruela del mono fuera de África se produjo en los Estados Unidos de América y se relacionó con el contacto con perros de la pradera infectados. Desde el 13 de mayo de 2022, se han notificado a la OMS casos de viruela del mono en 12 Estados Miembros que no son endémicos para el virus de la viruela del mono, en tres regiones de la OMS.

Se cree que la infección primaria de animal a humano se produce al manipular animales infectados por la viruela del mono, a través del contacto directo o indirecto, aunque los mecanismos exactos aún no están definidos. Se cree que la transmisión entre humanos se produce a través de aerosoles, así como del contacto directo con fluidos corporales, lesiones en la piel o tejido mucoso.

No existen tratamientos específicos para la viruela símica, pero se aconseja el manejo y apoyo sintomático, así como la administración de fármacos para las infecciones

bacterianas secundarias. Además, no existe ninguna vacuna específicamente diseñada contra este virus que haya sido autorizada todavía. Sin embargo, se ha observado que la vacuna contra la viruela otorga una protección cruzada.

El diagnóstico se realiza con muestras de lesiones cutáneas, como hisopos de lesiones vesiculares, exudados o costras. En el caso de los cultivos virales, las muestras deben obtenerse de las cavidades orofaríngeas o nasofaríngeas con un hisopo, sin embargo, se prefieren los métodos moleculares, como la PCR o la secuenciación, especialmente para la diferenciación de cepas.

Principio del test

Vitassay qPCR MonkeyPox se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de los genes *G2R* y *F3L* del virus de la viruela del mono. Tras la extracción de DNA, la presencia del virus de la viruela del mono se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5' - 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR MonkeyPox se trata de una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno endógeno permite el control del proceso de extracción y la detección de una posible reacción de inhibición. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como control interno endógeno (CI) (gen *HBB*, codificante para la subunidad beta de la hemoglobina presente en el DNA humano) que se espera que esté presente en todas las células humanas nucleadas. La amplificación de la secuencia diana de los genes *G2R* y *F3L* es detectada en el canal FAM, y la amplificación de la secuencia diana del gen *HBB* (β -globin) es detectada en el canal HEX.

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.

- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.
- 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.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR MonkeyPox ha sido testado en muestras de frotis faríngeos, líquido vesicular, exudados de vesículas y suero procedentes de pacientes con sospecha de infección por la viruela del mono. El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras clínicas deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios con o sin medios de transporte (según el tipo de muestra), etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se

recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Las muestras pueden transportarse a temperatura ambiente durante un máximo de 2 horas. Para un transporte de mayor duración (más de 2 horas), se recomienda el envío a -20°C o menos. Las muestras pueden conservarse congeladas a -20°C o menos (a -80°C idealmente) para una conservación de mayor duración. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- CDC (Specimen collection guidelines. Sitio web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>)
- 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)
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Extracción de DNA

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas se puede utilizar un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- MagDEA Dx SV Kit, utilizando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del MonkeyPox Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo para cada uno de los ensayos).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo reconstituido (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (Monkeypox virus), y HEX (Control Interno Endógeno, CI). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación y el procedimiento de extracción compruebe la emisión de señal de control interno endógeno (CI).

Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras), para garantizar que el *threshold* se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de *threshold*

puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. Se recomienda establecer los valores de *threshold* para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

Antes de analizar el resultado de las muestras debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación (Ct ≤40) en los canales FAM y HEX.

El control positivo incluye la diana del gen *housekeeping HHB* presente en el DNA humano, por lo tanto, se observan señales de amplificación en todos los canales, incluido el control interno endógeno.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct >40 o no señal) de FAM y HEX.

En el control negativo, 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* que se espera que esté presente en todas las células humanas nucleadas.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

<i>MonkeyPox</i> (FAM)	Control interno endógeno (HEX)	Interpretación	
+	+/- ¹	Válido	DNA del virus de la viruela del mono detectado
-	+ ²	Válido	DNA del virus de la viruela del mono no Detectado ²
-	- ²	Inválido	Test fallido ²

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

¹ En ocasiones, la detección del control interno endógeno 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. El control interno endógeno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct \leq 40 o no señal).

² En el caso de que la detección de las regiones diana de la viruela del mono resulte negativa, el CI endógeno debe mostrar una señal de amplificación con Ct \leq 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 valor de Ct > 35 del control interno endógeno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada).

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno endógeno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

La evaluación clínica de Vitassay qPCR MonkeyPox se llevó a cabo utilizando cinco hisopos de heridas de pacientes con sospecha de infección por viruela del mono. Los resultados obtenidos mostraron una muestra positiva, la cual fue confirmada por secuenciación.

El rendimiento clínico del kit se testó además mediante el uso de diferentes matrices (frotis faríngeo, líquido vesicular, exudados de vesículas y suero) recolectadas de un mismo paciente con sospecha de infección por el virus de la viruela del mono. Los resultados obtenidos fueron positivos para el virus en todas las muestras.

En conclusión, el kit de Vitassay qPCR MonkeyPox representa una herramienta de diagnóstico eficiente para la detección del virus de la viruela del mono, ya que los resultados muestran una alta concordancia.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de un estándar de la viruela del mono (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 2 copias de DNA por reacción para el virus de la viruela del mono en muestras de suero y 8 copias de DNA por reacción para el virus de la viruela del mono en muestras de frotis faríngeo (tasa positividad 95%).

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección del virus de la viruela del mono fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas con ninguna de las especies:

Pruebas de reactividad cruzada					
Metapneumovirus humano A y B	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Chikungunya virus cepa F24	-
Rhinovirus humano tipo C	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	Chikungunya virus cepa Martinique	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Legionella micdadei</i>	-	Chikungunya virus cepa S27 Petersfield	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	Chikungunya virus WHO IS 11785/16 (de aislado R91064)	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Adenovirus humano tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41	-	<i>Coxiella burnetii</i> cepa <i>Nine Mile Q</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Dengue virus serotipo 1, cepa Hawaii A	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Dengue virus serotipo 2, cepa New Guinea C	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipos A y C	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> no resistente a rifampicina	-	Dengue virus serotipo 3, cepa H87	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Parainfluenza virus humano 1, 2, 3 y 4	-	Dengue virus serotipo 4, cepa H241	-
Coronavirus humano 229E, OC43, NL63 y HKU1	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Tipo A1 y g885652	-	Japanese Encephalitis virus cepa Nakayama	-
MERS-Coronavirus	-	Bocavirus	-	Usutu virus	-
SARS-CoV-2 cepa 2019nCoV/USAWA1/2020	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i> cepa <i>Moroccan</i>	-
Enterovirus 68 y 71	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	Rift Valley Fever Virus cepa AR21229	-
Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-	Rift Valley Fever Virus cepa MP12	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 y B3	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	St Louis Encephalitis virus	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Virus Respiratorio Sincitial (VRS) A y B	-	<i>Theileria annulata</i>	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus	-	<i>Anaplasma marginale</i>	-	Tick-Borne Encephalitis virus cepa Neudorfl	-
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Bartonella henselae</i> cepa <i>Houston-1</i>	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Borrelia hermsii</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Leptospira</i>	-
Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1)	-	<i>Borrelia valaisiana</i>	-	West Nile virus cepa NY99	-

Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Borrelia azfelicii</i> cepa P-Ko/1984	-	West Nile virus cepa Heja	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	<i>Borrelia bavariensis</i>	-	West Nile virus cepa Ug37	-
Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-	<i>Borrelia bisetti</i>	-	Yellow Fever virus cepa 17D	-
Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	<i>Borrelia burgdorferi</i> cepa IRS	-	Yellow Fever virus cepa French Neurotropic	-
Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> cepa B31	-	Zika virus cepa asiática PF13/251013-18	-
Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	<i>Borrelia garinii</i> Tipo cepa	-	Zika virus cepa africana	-
Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Borrelia japonica</i>	-	Zika virus cepa FB-GWUH-2016	-
Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	Zika Virus French Polynesian, cepas 11468/16 y 11474/16	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Borrelia spielmanii</i>	-		

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR MonkeyPox se evaluó frente al virus de la viruela del mono, mostrando resultados positivos.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR MonkeyPox ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^I
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler 480 Instrument II (Roche)
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- QuantGene 9600 (BioEr Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^{II}

ⁱ: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

ⁱⁱ: Para el equipo Rotor-Gene® Q el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos del equipo.

Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de frotis faríngeo, líquido vesicular, exudados de vesículas y suero. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el MonkeyPox positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido la extracción de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); f) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante; g) mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de nuevos o desconocidos clados de viruela del mono. En caso de duda, consulte la sección Análisis e interpretación de resultados para comprobar la interpretación correcta de los resultados.
- La detección del DNA viral puede no indicar la presencia de virus viables y/o infecciosos o que el virus de la viruela del mono sea el agente causante de los síntomas clínicos.

- Los resultados negativos no impiden la infección por el virus de la viruela del mono y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar el virus.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con el virus de la viruela del mono, y se han descartado otras enfermedades, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, 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 CI endógeno negativa no impide la presencia de DNA de la viruela del mono en una muestra clínica.

Adjunto I. Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Roche
LightCycler® 480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}
LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}

Formatos especiales ⁽⁷⁾
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cycler
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 ⁽¹⁾
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena
qTOWER
BIONEER
Exicycler™ 96
BIOER
QuantGene 9600
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
QIAquant 96

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

Adjunto II. Canales de detección de los equipos a tiempo real más comunes

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480 II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition"
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III. Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

Intended use

Vitassay qPCR MonkeyPox allows the qualitative detection of genomic DNA specific for Monkeypox virus by real-time PCR in clinical samples of patients suspected of Monkeypox virus infection. This product is intended to aid in the diagnosis of Monkeypox virus infections, alongside the patient's clinical data, epidemiological risk factors and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR MonkeyPox 4x8-well strip, low profile	7041080
Vitassay qPCR MonkeyPox 4x8-well strip, high profile	7042080

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S080/ 7042S080	MonkeyPox strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C080	MonkeyPox Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8-cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex

- Micropipettes (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Human monkeypox virus, *Monkeypox* or MPXV, is one of the four viruses in the *Orthopoxvirus* genus of the *Poxviridae* family with capacity of infecting humans. The other three are the virus causing smallpox (VARV, or *variola major* virus), the *variola minor* virus, and the cowpox virus. This zoonotic double-stranded virus was not recognized as a distinct infection in humans until the 1970s, when the virus was isolated from a 9-month-old patient with smallpox suspicion in the Democratic Republic of Congo.

Most of the clinical manifestations caused by human monkeypox virus infection are indistinguishable to the smallpox. Before the onset of symptoms, there is an incubation period that usually lasts from 7 to 14 days. After that, there is an initial febrile prodrome which is accompanied by generalized headache and fatigue. The symptomatology usually evolves to a maxillary, cervical, or inguinal lymphadenopathy in many patients, prior to a typical rash development after 1 to 3 days after the fever appears. The rash progress to macules, papules, vesicles, pustules, and scabs before falling off. The symptoms usually last 2 to 4 weeks and the fatality rate has been reported to be between 1-10%, being higher in children.

Since the first description in humans in 1970, the monkey pox has been reported in 11 African countries and different outbreaks have been experienced. Specially in Nigeria, where since 2017 over 500 suspected and 200 confirmed cases have been registered (WHO).

This is a disease of global public health concern. In 2003, the first monkeypox outbreak outside of Africa was in the United States of America and was linked to contact with infected pet prairie dogs. Since 13 May 2022, cases of monkeypox have been reported to WHO from 12 Member States that are not endemic for monkeypox virus, across three WHO regions.

Primary animal-to-human infection is believed to occur when handling monkeypox-infected animals, via direct or indirect contact, although the exact mechanisms are not yet defined. Human-to-human transmission between humans is thought to be through aerosols as well as direct contact with body fluids, lesions on the skin or mucosal tissue.

There are no specific treatments for monkeypox, but symptomatic management and support, as well as drug administration for the secondary bacterial infections are advisable. Furthermore, there is not any vaccine specifically designed against this virus that has been yet licensed. However, it has been observed that the smallpox vaccine grants a cross-protection.

Diagnosis is carried out with specimens from skin lesions as swabs of vesicular lesions, exudate, or crusts. In case of viral cultures, samples must be obtained from the oropharyngeal or nasopharyngeal cavities with a swab, however molecular methods, such as PCR or sequencing are preferred, especially for the differentiation of strains.

Principle of the test

Vitassay qPCR MonkeyPox is based on the real-time amplification of a conserved region of *G2R* and *F3L* genes of MonkeyPox virus. After DNA extraction, the MonkeyPox virus presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR MonkeyPox is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an endogenous internal control allows the extraction process control and the detection of a possible inhibition reaction. The assay uses a human housekeeping gene as an endogenous internal control (IC) (*HHB* gene, hemoglobin subunit beta gene present in human DNA) that is expected to be present in all nucleated human cells. The amplification of the target sequence *G2R* and *F3L* genes is detected through the FAM channel, and the amplification of the endogenous internal control (IC) is detected through the HEX channel.

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.

- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the test functionality.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. The Vitassay qPCR MonkeyPox has been tested on throat swabs, vesicular fluid, vesicle swabs and serum samples from patients suspected of Monkeypox virus infection. Other sample types must be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type), correctly labelled and promptly processed to ensure the test's quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The specimens should be transported at room temperature for up to 2 hours. For long term transport (more than 2 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. The samples can be stored frozen at -20°C or lower (at -80°C ideally) for long-term conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- CDC (Specimen collection guidelines. Website: <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>)
- 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)
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

DNA extraction

For nucleic acid isolation from clinical specimens, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The assay has been validated with the following extraction kits:

- MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized MonkeyPox Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run for each assay.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.

- Pipette 5 µL of DNA sample, negative control (yellow tube) or reconstituted positive control (red tube) and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (Monkeypox virus) and HEX (Endogenous Internal Control) channels. Depending on the equipment used select the proper detection channel (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, and the extraction procedure, check the endogenous internal control (IC) signal emission.

Use the positive control amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of sample results), to ensure that the threshold falls within the exponential phase of the amplification curves and above any background noise signals. The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

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

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve (Ct ≤40) in FAM and HEX channels, which validates the reaction.

The positive control includes the human *housekeeping HHB* gene target; therefore, amplification signals are observed in all target channels, including the Endogenous Internal Control.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence (Ct >40 or no signal) in FAM and HEX channels, which validates the reaction.

In Negative Control, 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 that is expected to be present in all nucleated human cells.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

MonkeyPox (FAM)	Endogenous Internal Control (HEX)	Interpretation	
+	+/- ¹	Valid	MonkeyPox DNA detected
-	+ ²	Valid	MonkeyPox DNA not Detected ²
-	- ²	Invalid	Test failed ²

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >40 or no signal)

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

² In the case of negative MonkeyPox virus target genes detection, endogenous IC 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 sample. If there is a signal' absence or Ct value > 35 of Endogenous Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. 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).

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an endogenous Internal Control (IC) is included in each reaction. Moreover, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The Vitassay qPCR MonkeyPox kit's clinical performance was tested using five wound swabs from patients suspected of Monkeypox virus infection. The obtained results show one positive sample confirmed by sequencing.

In addition, the clinical performance has also been tested by analyzing different matrices (throat swab, vesicular fluid, vesicle swabs and serum) collected from the same patient with suspected Monkeypox virus infection. The obtained results were positive for Monkeypox virus for all the samples.

In conclusion, Vitassay qPCR MonkeyPox represent an efficient diagnostic tool for the Monkeypox virus detection, as the results show high agreement.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of a standard from the Monkeypox virus ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction. This assay has a detection limit of 2 DNA copies per reaction for Monkeypox virus in serum samples and 8 DNA copies per reaction for Monkeypox virus in throat swabs (positive rate 95%).

Analytical specificity

The analytical specificity for the Monkeypox virus detection was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed with any of the species:

Cross-reactivity testing					
Human metapneumovirus A and B	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Chikungunya virus strain F24	-
Human rhinovirus type C	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	Chikungunya virus strain Martinique	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Legionella micdadei</i>	-	Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	Chikungunya virus WHO IS 11785/16 (from isolate R91064)	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	<i>Coxiella burnetii</i> strain <i>Nine Mile Q</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Dengue virus serotype 1, strain Hawaii A	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Dengue virus serotype 2, strain New Guinea C	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	-	Dengue virus serotype 3, strain H87	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Dengue virus serotype 4, strain H241	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-	Japanese Encephalitis virus strain Nakayama	-
MERS-Coronavirus	-	Bocavirus	-	Usutu virus	-
SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USAWA1/2020	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i> strain <i>Moroccan</i>	-
Enterovirus 68 and 71	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	Rift Valley Fever Virus strain AR21229	-
Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-	Rift Valley Fever Virus strain MP12	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	St Louis Encephalitis virus	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B	-	<i>Theileria annulata</i>	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus	-	<i>Anaplasma marginale</i>	-	Tick-Borne Encephalitis virus strain Neudorfl	-
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Bartonella henselae</i> strain <i>Houston-1</i>	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Borrelia hermsii</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Leptospira</i>	-
Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1)	-	<i>Borrelia valaisiana</i>	-	West Nile virus strain NY99	-

Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Borrelia azfелиi</i> strain P-Ko/1984	-	West Nile virus strain Heja	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	<i>Borrelia bavariensis</i>	-	West Nile virus strain Ug37	-
Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-	<i>Borrelia bisetti</i>	-	Yellow Fever virus strain 17D	-
Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	<i>Borrelia burgdorferi</i> strain IRS	-	Yellow Fever virus strain French Neurotropic	-
Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> strain B31	-	Zika virus Asian strain PF13/251013-18	-
Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	<i>Borrelia garinii</i> Type strain	-	Zika virus African strain	-
Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Borrelia japonica</i>	-	Zika virus strain FB-GWUH-2016	-
Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	Zika Virus French Polynesian, strains 11468/16 and 11474/16	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Borrelia spielmanii</i>	-		

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR MonkeyPox kit's reactivity was evaluated against Monkeypox virus, showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR MonkeyPox has been validated on the following equipment:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler 480 Instrument II (Roche)
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- QuantGene 9600 (BioEr Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ¹¹

¹: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

¶: For Rotor-Gene® Q thermocycler the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific tubes of the equipment.

Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with DNA extracted from throat swabs, vesicular fluid, vesicle swabs and serum samples. The use of other samples has not been established.
- The correct test performance depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- 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 either by MonkeyPox Positive Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including DNA extraction); c) DNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) pathogen load below the limit of detection for the assay; e) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); f) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures; g) mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown Monkeypox virus clades. If in doubt, refer to section Analysis and interpretation of results to check the correct interpretation of the results.
- Viral DNA detection may not indicate the presence of viable and/or infectious virus or that Monkeypox virus is the causative agent for clinical symptoms.
- The negative results do not preclude Monkeypox virus infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimum specimen types for Monkeypox virus identification and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the virus.

- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible Monkeypox virus infection, and other diseases have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type, and its previous treatment, among others.
- Some samples may fail to exhibit *HBB* amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative endogenous IC signal does not preclude the Monkeypox virus presence in a clinical specimen.

Attached I. Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler®480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler®96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cyclor	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Precision System Science Co., Ltd.	Qiagen
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
Qiagen	
Rotor-Gene® Q	

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) See Attached III to configure exposure settings.

Attached II. Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR thermocyclers are specified in the following table:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III. Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

*If result in FAM channel is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.










Bibliography/Bibliografía

1. Berhanu A, Prigge JT, Silvera PM, Honeychurch KM, Hruby DE, Grosenbach DW. (2015). Treatment with the smallpox antiviral tecovirimat (ST-246) alone or in combination with ACAM2000 vaccination is effective as a postsymptomatic therapy for monkeypox virus infection. *Antimicrob Agents Chemother.* Jul;59(7):4296-300.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Monkeypox. Available at: <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/> Accessed May 2022
3. Edghill-Smith Y, Golding H, Manischewitz J, King LR, Scott D, Bray M, Nalca A, Hooper JW, Whitehouse CA, Schmitz JE, Reimann KA, Franchini G. (2005). Smallpox vaccine-induced antibodies are necessary and sufficient for protection against monkeypox virus. *Nat Med.* Jul;11(7):740-7.
4. Ladnyj ID, Ziegler P, Kima E. (1972) A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. *Bull World Health Organ.* 46(5):593-7.
5. Li Y, Zhao H, Wilkins K, Hughes C, Damon IK. (2010). Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. *J Virol Methods.* Oct;169(1):223-7.
6. McCollum AM, Damon IK. (2014). Human monkeypox. *Clin Infect Dis.* 2014 Jan;58(2):260-7. Erratum in: *Clin Infect Dis.* Jun;58(12):1792.
7. Petersen E, Kantele A, Koopmans M, Asogun D, Yinka-Ogunleye A, Ihekweazu C, Zumla A. (2019). Human Monkeypox: Epidemiologic and Clinical Characteristics, Diagnosis, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am.* Dec;33(4):1027-1043.
8. World Health Organization (WHO). MonkeyPox. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/monkeypox>. Accessed May 2022
9. World Health Organization (WHO). "Multi-Country Monkeypox Outbreak in Non-Endemic Countries.". *Disease Outbreak News.*, 21 May 2022, Available at: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON385> Accessed May 2022

Trademarks

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

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
			Número de referencia Catalogue number



VA Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com