

Mpox disease Emergency Use Listing Procedure (EUL) for IVDs
Product: VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit
EUL Number: MPXV-12649-243-00
Outcome: Accepted.

The EUL process is intended to expedite the availability of in vitro diagnostics needed in public health emergency situations and to assist interested UN procurement agencies and Member States in determining the acceptability of using specific products in the context of a Public Health Emergency of International Concern (PHEIC), based on an essential set of available quality, safety, and performance data. The EUL procedure includes the following:

- Quality Management Systems Review and Plan for Post-Market Surveillance: a desktop review of the manufacturer's Quality Management System documentation and specific manufacturing documents.
- Product Dossier Review: assessment of the documentary evidence of safety and performance. This evaluation of limited scope is to verify critical analytical and performance characteristics.

The VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit, with product codes VS-MPX101L, VS-MPX101H, VS-MPX106L, VS-MPX106H, VS-MPX112L, VS-MPX112H, VS-MPX113L, VS-MPX113H, VS-MPX101, VS-MPX136, VS-MPX172, and VS-MPX196T, CE-mark regulatory version manufactured by CerTest Biotec, S.L, located at Pol. Industrial Rio Gallego II. Calle J, N°1 50840 San Mateo de Gallego, Zaragoza, Spain, was listed as eligible for WHO procurement on 9 September 2025.

Intended use:

According to the claim of intended use from CerTest Biotec, S.L., *"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 lesion swabs from individuals suspected of Monkeypox virus infection by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of Monkeypox virus infection in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, amplified using real-time PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Monkeypox virus.*

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 in vitro diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and nucleic acid extraction system)."

Validated specimen type:

Human skin lesion swabs collected using sterile synthetic fibre swabs with plastic placed immediately into a sterile transport tube containing Universal transport medium (UTM Universal Transport Medium (Copan) or in Viral Transport Medium (-VTM- Virus Transport and Preservation Medium (Non-inactivated) (biocomma)).

Test kit contents:

- VS-MPX101L: 1 x 8-well strips, low profile
- VS-MPX101H: 1 x 8-well strips, high profile
- VS-MPX106L: 6 x 8-well strips, low profile
- VS-MPX106H: 6 x 8-well strips, high profile
- VS-MPX112L: 12 x 8-well strips, low profile
- VS-MPX112H: 12 x 8-well strips, high profile
- VS-MPX113L: 96-well plate, low profile
- VS-MPX113H: 96-well plate, high profile
- VS-MPX101: 2 x 4-well strips, Rotor-Gene
- VS-MPX136: 9 x 4-well strips, Rotor-Gene
- VS-MPX172: 18 x 4-well strips, Rotor-Gene
- VS-MPX196T: 4 tubes x 24 reactions

Items required but not provided:

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e., individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tubes format.
- DNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30° C to - 10° C and/or $\leq - 70^{\circ}$ C.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene instruments). Only for Rotor Gene format.
- Blank sample.

Validated instruments for the different workflows

1. MagDEA Dx SV Kit / magLEAD 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).
2. MagDEA Dx SV Kit / magLEAD 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology).
3. MagDEA Dx SV Kit / magLEAD 12gC instrument (Precision System Science Co.) + Rotor-Gene Q (QIAGEN).
4. MagDEA Dx SV Kit / magLEAD 12gC instrument (Precision System Science Co.) + 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems).
5. QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

6. QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology).
7. QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + Rotor-Gene Q (QIAGEN).
8. QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems).
9. MagCore Viral Nucleic Acid Extraction Kit, using the MagCore automated nucleic acid extractors (RBC Bioscience) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Validated thermocycler software:

- CFX Maestro 2.3 software, versions 5.0.021.0616 and 5.3.022.1030, in Bio-Rad instruments.
- Realtime_PCR software, v7.9, specifically version 7.9.9.25 (last edition), in DNA-Technology thermocycler.
- Rotor-Gene Q Series Software 2.3.5 (Build 1), used in Rotor-Gene Q (QIAGEN) instrument.
- 7500 Software v2.0.6, applied in the Applied Biosystems thermocycler.

Validated automated extraction systems software:

- 1.0.3 firmware version 1.2A, belonging to the magLEAD 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- L0-0205-D008, included in the MagCore automated nucleic acid extractors (RBC Bioscience).

Storage:

The test kit must be stored at 2-40 °C.

Shelf-life upon manufacture:

The shelf-life is currently assigned 24 months dating.

Warnings/limitations:

Please refer to the Instructions for Use attached to this public report.

Product dossier assessment

CerTest Biotec, S.L. submitted the product dossier for the VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit in alignment with the Instructions and requirements for Emergency Use Listing (EUL) Submission: In vitro diagnostics detecting Monkeypox virus nucleic acid (PQDx_457). The WHO reviewed the information provided in the dossier.

The risk-benefit assessment conclusion was acceptable.

Quality Management Systems Review

To establish eligibility for WHO procurement, CerTest Biotec, S.L. was asked to provide up-to-date information about the status of its quality management system.

Based on the WHO's review of the submitted quality management system documentation, CerTest Biotec, S.L. provided sufficient information to fulfil the requirements described in the Instructions and requirements for EUL Submission: In vitro diagnostics detecting Monkeypox virus nucleic acid (PQDx_457).

The conclusion of the quality management system assessment was acceptable.

Plan for Post-Market Surveillance

Post-market surveillance, including monitoring all customer feedback, detecting and acting on adverse events, product problems, non-conforming goods and processes is a critical component of minimising the potential harm of an IVD listed for emergency use.

The following post-EUL activities are required to maintain the EUL status:

1. Notification to WHO of any planned changes to a prequalified product, in accordance with *“Reportable changes to WHO prequalified and emergency use listed in vitro diagnostics”*¹; and
2. Post-market surveillance activities, in accordance with *“WHO guidance on post-market surveillance of in vitro diagnostics” (ISBN 978 92 4 150921 3)*².

CerTest Biotec, S.L. is also required to submit an annual report summarising sales data and all complaints. Certain complaints and changes to the product must be notified immediately to WHO, as per the above-mentioned documents. The sales data will serve as denominator data to guide the frequency of re-inspection.

The manufacturer has committed to ensuring that post-emergency use listing safety, quality, and performance monitoring activities are in place, which are in accordance with WHO guidance on post-market surveillance of in vitro diagnostics.

Scope and duration of procurement eligibility

The VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit, with product codes VS-MPX101L, VS-MPX101H, VS-MPX106L, VS-MPX106H, VS-MPX112L, VS-MPX112H, VS-MPX113L, VS-MPX113H, VS-MPX101, VS-MPX136, VS-MPX172, and VS-MPX196T, manufactured by CerTest Biotec, S.L., is eligible for WHO procurement for 12 months from the day of listing. The assay detects the monkeypox virus nucleic acid, including Clade I and Clade II. This listing does not infer that the product meets WHO prequalification requirements and does not mean that the product is listed as WHO-prequalified. As part of the ongoing requirements for listing

¹ <https://iris.who.int/handle/10665/381373>

² <https://iris.who.int/handle/10665/337551>

as eligible for WHO procurement, CerTest Biotec, S.L. must engage in post-market surveillance activities to ensure that the product continues to meet safety, quality, and performance requirements. CerTest Biotec, S.L. is required to notify WHO of any complaints, including adverse events related to the use of the product, within 10 days.

WHO reserves the right to rescind eligibility for WHO procurement if additional information on the safety, quality, and performance during post-market surveillance activities and if new data becomes available to WHO that changes the risk-benefit balance.

Labelling

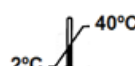
- 1. Labels**
- 2. Instructions for use**

1.0 Labels

1.1 Low Profile

1.1.1 VS-MPX101L Well Strip (low profile)

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit , Low Profile



certest.es/
viasure/labeling

REF VS-MPX101L

LOT MPX101L-XXX

yy **yy** **mm**

1 x MPX 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
1 x Tear-off 8-cap strips



(01)08435440240556
(17)991231
(10)MPX101L000

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit

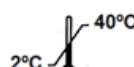


CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-MPX101L v.00

1.1.2 VS-MPX106L Well Strip (low profile)

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit , Low Profile



certest.es/
viasure/labeling

REF VS-MPX106L

LOT MPX106L-XXX

yy **yy** **mm**

6 x MPX 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
6 x Tear-off 8-cap strips



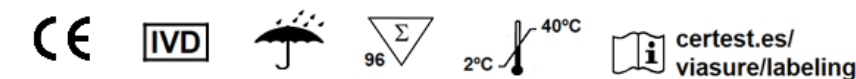
(01)08435440240471
(17)991231
(10)MPX106L000

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit



CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-MPX106L v.00

1.1.3 VS-MPX112L Well Strip (low profile)**VIASURE *Monkeypox virus***
Real Time PCR Detection Kit , Low Profile**REF** VS-MPX112L**LOT** MPX112L-XXX

yyyy-mm

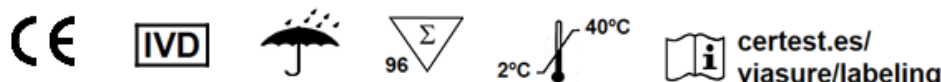
12 x MPX 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips

**UDI**

(01)08435440240495
(17)991231
(10)MPX112L000

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit **CERTEST BIOTEC S.L.** Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-MPX112L v.00

1.1.4 VS-MPX1SL Well Strip (low profile)**VIASURE *Monkeypox virus***
Real Time PCR Detection Kit , Low Profile**REF** VS-MPX112L**LOT** MPX112L-XXX

yyyy-mm

12 x MPX 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips

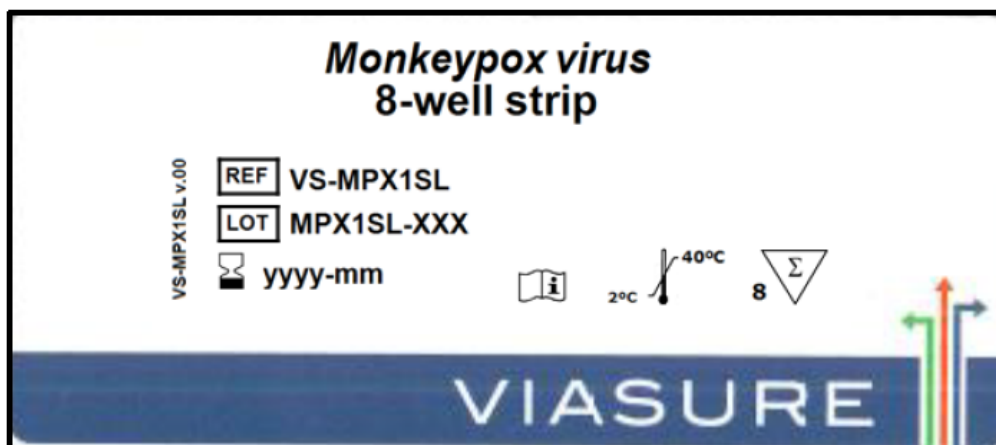
**UDI**

(01)08435440240495
(17)991231
(10)MPX112L000

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit **CERTEST BIOTEC S.L.** Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-MPX112L v.00

1.1.5 VS-MPX1SL Well Strip (low profile) in aluminium pouch

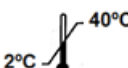


1.1.6 VS-MPX113L Well Plate (low profile)

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit , Low Profile







certest.es/viasure/labeling

REF VS-MPX113L **LOT** MPX113L-XXX  yyyy-mm

1 x MPX 96-well plate
 1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
 1 x Positive Control
 1 x Negative Control (1 mL)
 1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
 12 x Tear-off 8-cap strips



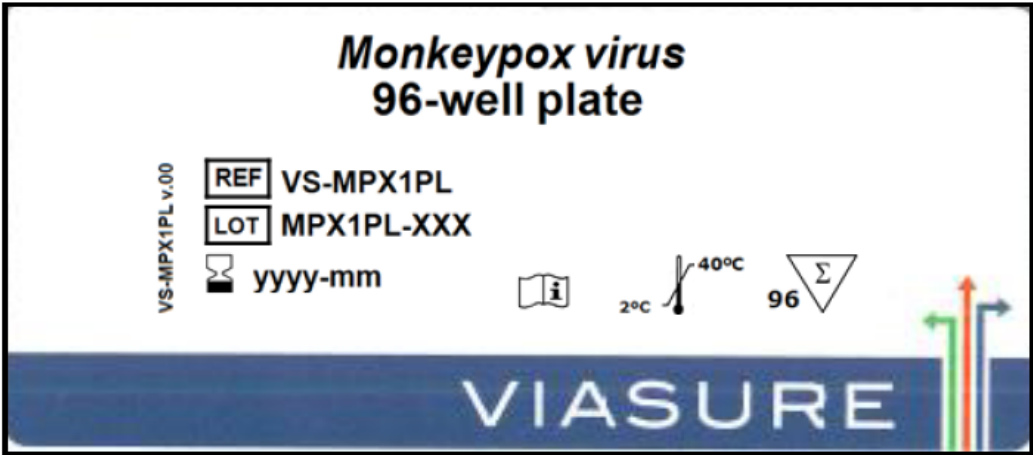
 (01)08435440240518
 (17)991231
 (10)MPX113L000

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit

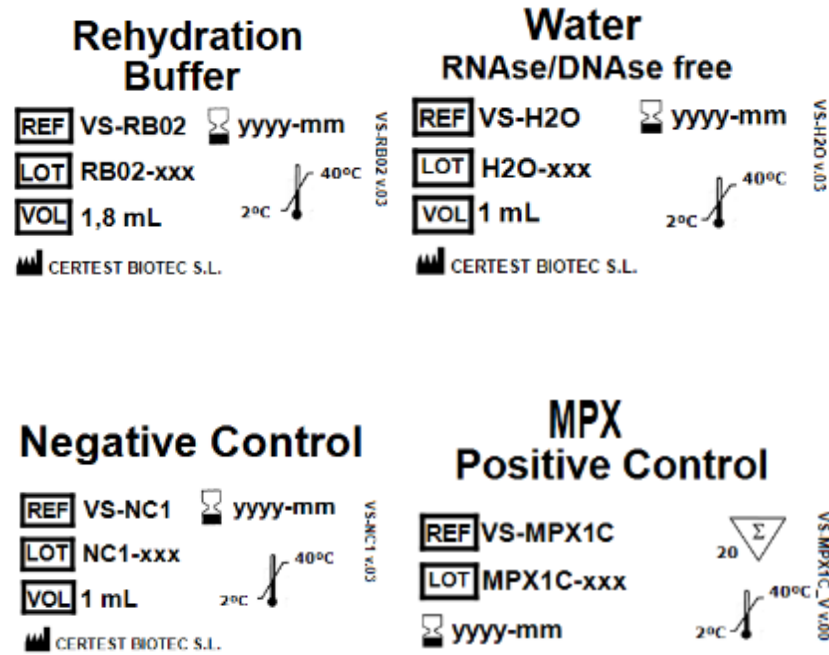

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

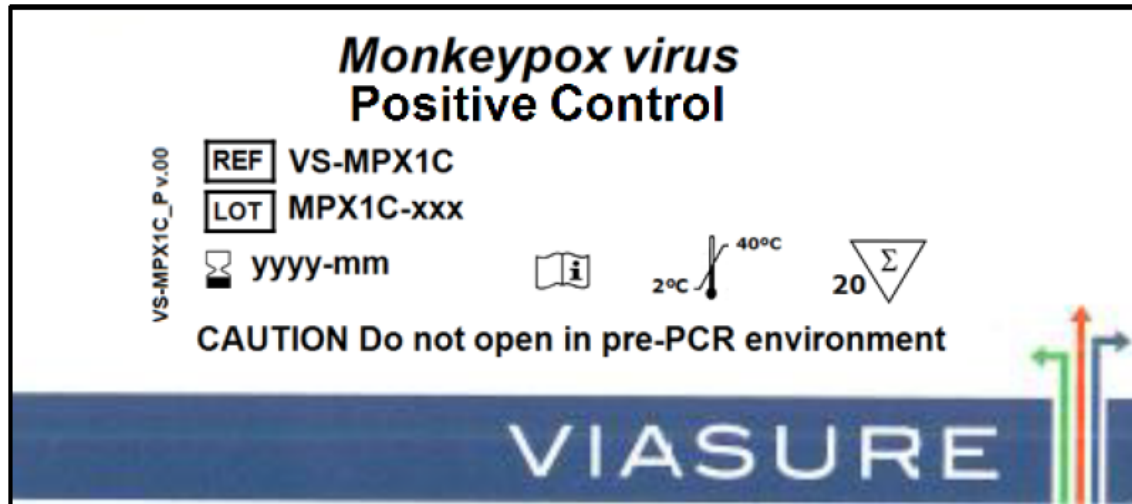
VS-MPX113L v.00

1.1.7 VS-MPX1PL Plate (low profile) in aluminium pouch



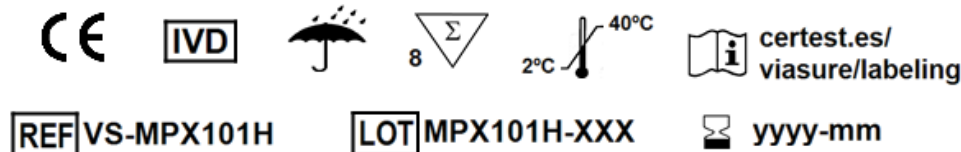
1.1.8 Vial labels





1.1.9 VS-MPX101H Well Strip (high profile)

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit , High Profile



1 x MPX 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
1 x Tear-off 8-cap strips



UDI

(01)08435440240563
(17)991231
(10)MPX101H000

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit



CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-MPX101H v.00

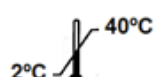
1.1.10 VS-MPX106H Well Strip (high profile)

VIASURE *Monkeypox virus*

Real Time PCR Detection Kit , High Profile



48

[certest.es/
viasure/labeling](https://certest.es/viasure/labeling)**REF** VS-MPX106H**LOT** MPX106H-XXX

yyyy-mm

6 x MPX 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
6 x Tear-off 8-cap strips



(01)08435440240488
(17)991231
(10)MPX106H000

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit



CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-MPX106H v.00

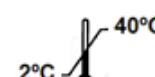
1.1.11 VS-MPX112H Well Strip (high profile)

VIASURE *Monkeypox virus*

Real Time PCR Detection Kit , High Profile



96

[certest.es/
viasure/labeling](https://certest.es/viasure/labeling)**REF** VS-MPX112H**LOT** MPX112H-XXX

yyyy-mm

12 x MPX 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips



(01)08435440240501
(17)991231
(10)MPX112H000

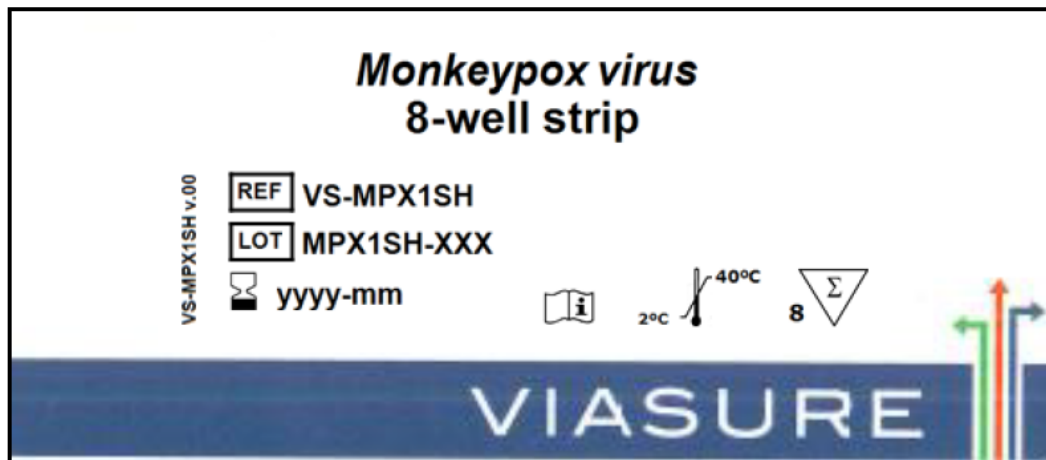
VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit



CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-MPX112H v.00

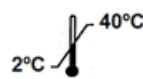
1.1.12 VS-MPX1SH Well Strip (high profile)



1.1.12 VS-MPX113H Well Strip (high profile)

VIASURE *Monkeypox virus*

Real Time PCR Detection Kit , High Profile


[certest.es/
viasure/labeling](http://certest.es/viasure/labeling)

REF VS-MPX113H

LOT MPX113H-XXX

yyyy-mm

1 x MPX 96-well plate
 1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
 1 x Positive Control
 1 x Negative Control (1 mL)
 1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
 12 x Tear-off 8-cap strips



(01)08435440240525
 (17)991231
 (10)MPX113H000

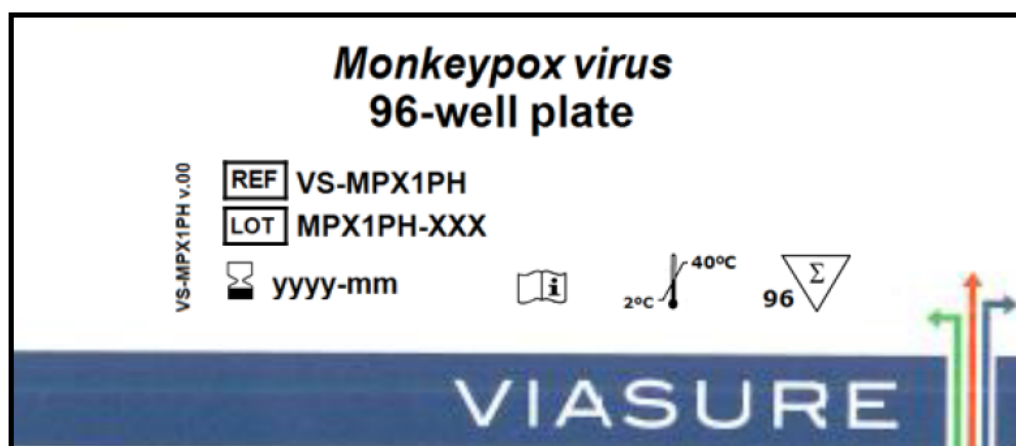
VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit



CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-MPX113H v.00

1.1.13 VS-MPX1PH Well Strip (high profile)



Vial labels

**Rehydration
Buffer**

REF VS-RB02
LOT RB02-xxx
VOL 1,8 mL
CERTEST BIOTEC S.L.

yyyy-mm
2°C 40°C
VS-RB02 v.03

**Water
RNAse/DNAse free**

REF VS-H2O
LOT H2O-xxx
VOL 1 mL
CERTEST BIOTEC S.L.

yyyy-mm
2°C 40°C
VS-H2O v.03

Negative Control

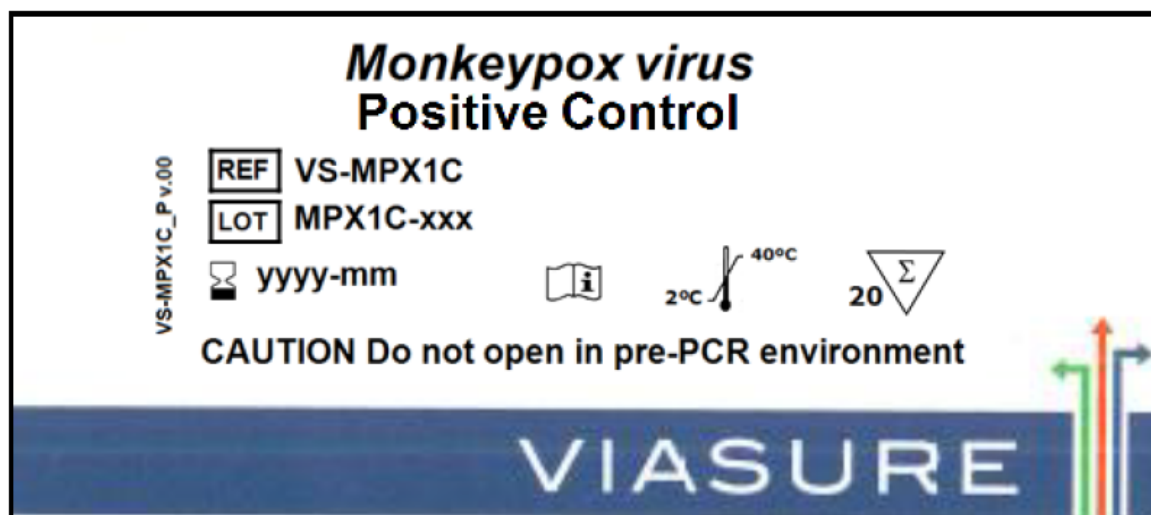
REF VS-NC1
LOT NC1-xxx
VOL 1 mL
CERTEST BIOTEC S.L.

yyyy-mm
2°C 40°C
VS-NC1 v.03

**MPX
Positive Control**

REF VS-MPX1C
LOT MPX1C-xxx
yyyy-mm

20
2°C 40°C
VS-MPX1C v.00



1.1.14 VS-MPX101 Well Strip (Rotor Gene)

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit , Rotor-Gene

CE IVD 8 2°C to 40°C [certest.es/
viasure/labeling](http://certest.es/viasure/labeling)

REF VS-MPX101 LOT MPX101-XXX yyyy-mm

2 x MPX 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNAse free (1 mL)
2 x Tear-off 4-cap strips

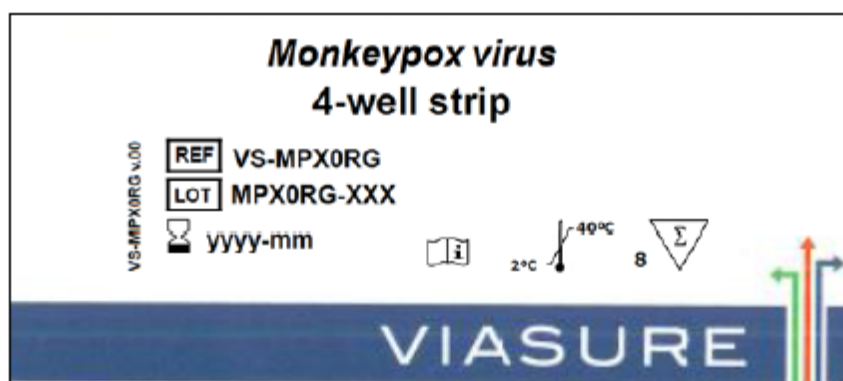
UDI
(01)08435440240570
(17)991231
(10)MPX101000

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

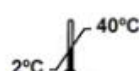
VS-MPX101 v.00

1.1.15 Well Strip (Rotor-Gene) in aluminium pouch



1.1.16 VS-MPX136 Well Strip (Rotor Gene)

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit , Rotor-Gene



[certest.es/
viasure/labeling](http://certest.es/viasure/labeling)

REF VS-MPX172

LOT MPX172-XXX

Exp yyyy-mm

18 x MPX 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
18 x Tear-off 4-cap strips



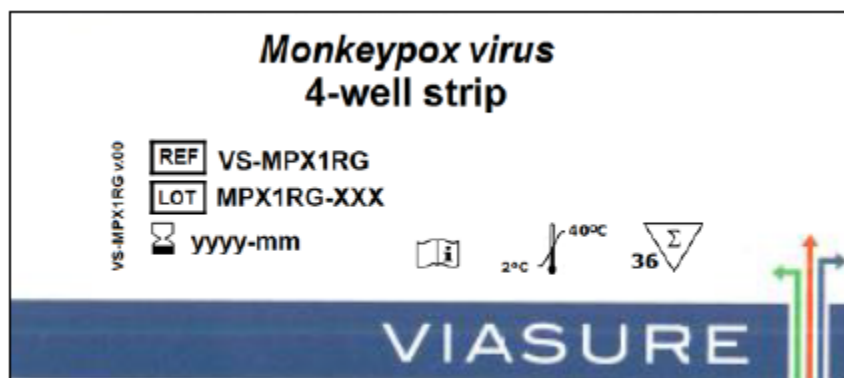
(01)08435440240549
(17)991231
(10)MPX172000

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit

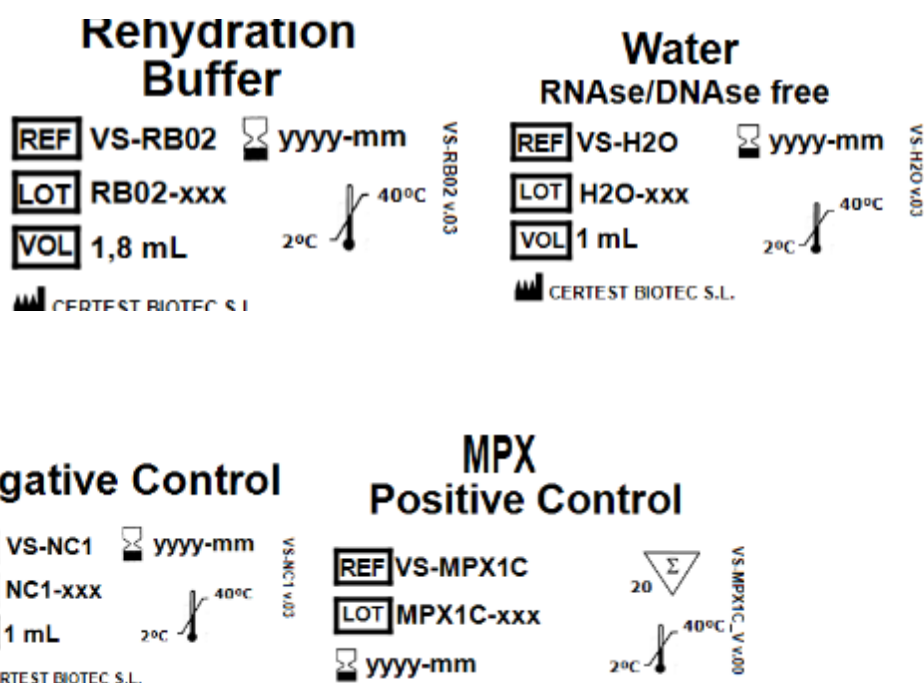
 CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

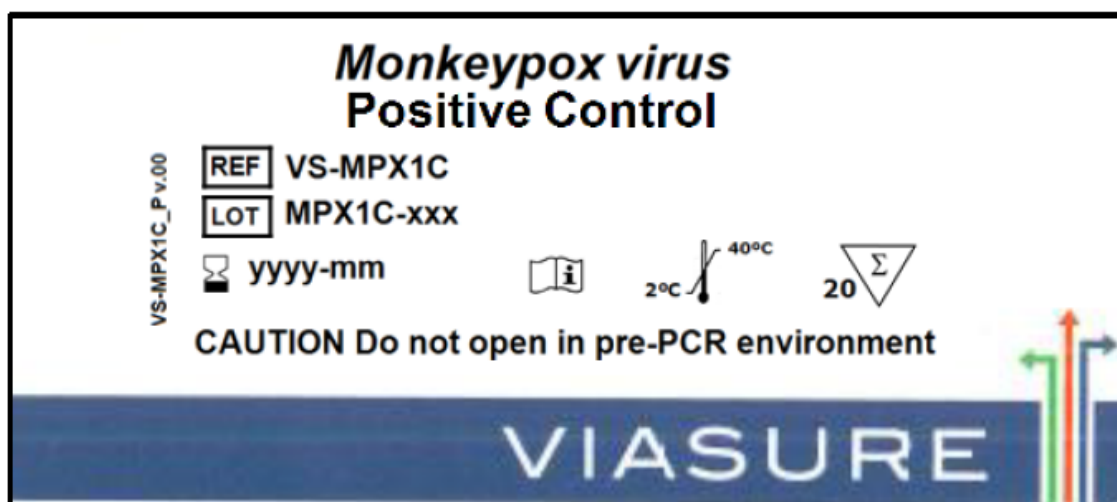
VS-MPX172 v.00

1.1.17 VS-MPX1RG Well Strip (Rotor-Gene) in aluminium pouch



1.1.18 Vial labels





1.1.19 VS-MPX196T Tube (Reaction-Mix Tube)

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit , Tube Format

CE IVD certest.es/viasure/labeling

REF VS-MPX196T LOT MPX196T-XXX yyyy-mm

4 x MPX Reaction-Mix tubes
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)

UDI
(01)08435440240587
(17)991231
(10)MPX196T000

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

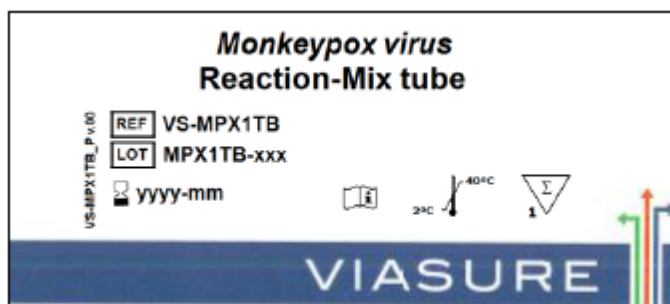
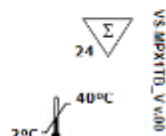
VS-MPX196T v.00

1.1.20 Vial labels

**MPX
Reaction-Mix tube**

REF VS-MPX1TB
LOT MPX1TB-xxx

yyy-mm

**Rehydration
Buffer**

REF VS-RB02 yyy-mm

LOT RB02-xxx

VOL 1,8 mL

CERTEST BIOTEC S.L.

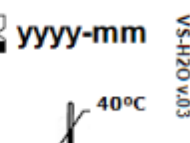
**Water
RNase/DNase free**

REF VS-H2O yyy-mm

LOT H2O-xxx

VOL 1 mL

CERTEST BIOTEC S.L.

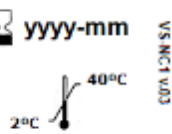
**Negative Control**

REF VS-NC1 yyy-mm

LOT NC1-xxx

VOL 1 mL

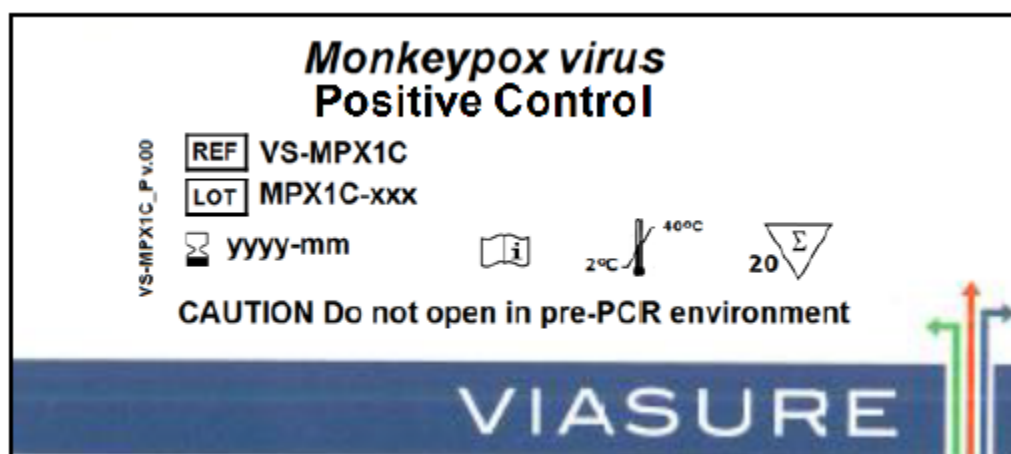
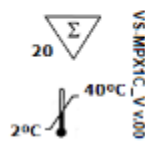
CERTEST BIOTEC S.L.

**MPX
Positive Control**

REF VS-MPX1C

LOT MPX1C-xxx

yyy-mm



2.0 Instructions for Use³

³ English version of the IFU was the one that was assessed by WHO. It is the responsibility of the manufacturer to ensure correct translation into other languages.



Monkeypox virus

Instructions for use

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 <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MPX101L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MPX101H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MPX106L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MPX106H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MPX112L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MPX112H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MPX113L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MPX113H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX101
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX136
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX172

Table A 1. References for Open and Rotor-Gene format with internal control products. / *Referencias para productos Open y Rotor-Gene 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 <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MPX196T

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

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	8
5. Reagents and equipment to be supplied by the user	8
6. Transport, storage and use conditions	10
7. Precautions for users	11
8. Test procedure	13
8.1. Specimen collection, transport and storage	13
8.2. DNA extraction	15
9. Result interpretation	16
9.1. References with internal control (references in Annexes 1 and 2)	16
10. Limitations of the test.....	18
11. Quality control	20
12. Analytical performance characteristics	20
12.1. Analytical linearity	20
12.2. Analytical sensitivity. Limit of Detection (LoD).....	21
12.3. Measuring range.....	22
12.4. Accuracy	22
12.4.1. Trueness (Veracity)	22
12.4.2. Precision.....	23
12.4.3. Accuracy	25
12.5. Analytical specificity and reactivity	26
12.5.1. Analytical specificity.....	26
12.5.2. Analytical reactivity	39
12.6. Metrological traceability	40
13. Clinical performance characteristics	40
ANNEX 1	43
A1.1 Principle of the procedure	43

A1.2 Reagents provided	43
A1.3 Test procedure	45
A1.3.1 Lyophilised positive control	45
A1.3.2 PCR protocol	45
ANNEX 2	47
A2.1 Principle of the procedure	47
A2.2 Reagents provided	47
A2.3 Test procedure	48
A2.3.1 Lyophilised positive control	48
A2.3.2 Lyophilised Reaction-Mix tube	48
A2.3.3 PCR protocol	48

Contenido

1. Uso previsto	50
2. Introducción y explicación	50
3. Procedimiento	51
4. Reactivos suministrados	52
5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario	52
6. Condiciones de transporte, almacenamiento y uso	54
7. Precauciones para el usuario	56
8. Procedimiento del test	58
8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	58
8.2. Extracción de DNA	60
9. Interpretación de resultados	60
9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	60
10. Limitaciones del test	63
11. Control de calidad	65
12. Características analíticas del funcionamiento del test	65
12.1. Linealidad analítica	65
12.2. Sensibilidad analítica. Límite de Detección (LoD)	66

12.3.	Rango de medición	67
12.4.	Exactitud	67
12.4.1	Veracidad (Sesgo)	67
12.4.2.	Precisión	68
12.4.1.	Exactitud	70
12.5.	Especificidad y reactividad analítica.....	71
12.5.1.	Especificidad analítica	71
12.5.2.	Reactividad analítica.....	85
12.6.	Trazabilidad metrológica.....	86
13.	Características del funcionamiento clínico.....	86
ANEXO 1		89
A1.1	Procedimiento	89
A1.2	Reactivos suministrados.....	89
A1.3	Procedimiento del test	91
A1.3.1	Control positivo liofilizado	91
A1.3.2	Protocolo PCR	91
ANEXO 2		93
A2.1	Procedimiento	93
A2.3	Procedimiento del test	94
A2.3.1	Control positivo liofilizado	94
A2.3.2	Mezcla de reacción liofilizada	94
A2.3.3	Protocolo PCR	94
Bibliography/Bibliografía.....		96
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>		97
Trademarks		97

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 lesion swabs from individuals suspected of Monkeypox virus infection by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of Monkeypox virus infection in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, amplified using real-time PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Monkeypox virus.

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 *in vitro* diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and nucleic acid extraction system).

2. Summary and Explanation

Monkeypox virus (MPXV) is a linear, double-stranded DNA virus which belongs to the genus *orthopoxvirus* in the family of *Poxviridae*, known for being the responsible of causing the monkeypox disease (mpox) (Chauhan et al., 2023; Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023; WHO, 2024). This disease is a zoonotic viral condition with symptoms very similar to the ones caused by other *orthopoxvirus* (such as variola virus or cowpox virus), which includes eruptive skin lesions, rash, fever, fatigue and lymphadenopathy (Chauhan et al., 2023; Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023). Mpox is described as self-limiting and less severe than the close condition smallpox, but may become complicated depending on the viral strain and the individual immune status; for example, some population risk groups are children, pregnant women or immunocompromised individuals (Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023; WHO, 2024). Two clades have been described so far, the West African (currently known as clade II) and the Congo Basin (Central African, currently known as clade I) (Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023; WHO, 2024). These are very different in relation to their epidemiologic, clinical characteristics and geographical localisation (Qudus et al., 2023).

Person-to-person MPXV transmission may occur directly by contact with skin lesions, body fluids, or respiratory secretions from infected individuals, or indirectly by contact with infected objects or linens (Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023; WHO, 2024). Then, this virus enters the healthy individual's body through mucous membranes or broken skin, and subsequently, it spreads via tissue-resident immune cells and draining lymph nodes (Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023), giving rise to an incubation period of 6-13 days usually, although possible to range from 5-21 days (WHO, 2024).

Since the first mpox cases in humans described in 1970s in African countries, infections have been steadily increased throughout these countries until its spreading to non-endemic regions, including USA and European countries (Chauhan et al., 2023; Qudus et al., 2023). In 2022, multi-country outbreaks were

described for the first time, due to human-to-human transmission through sexual contact (Chauhan et al., 2023). According to the WHO and as reproduce the ECDC, since the beginning of mpox surveillance in 2022 and up to July 2024, more than 100,000 confirmed cases due to clades I and II, including more than 200 deaths, were reported in more than 120 countries globally (ECDC, 2024; WHO, 2024a, 2024c). In 14th August of 2024, the WHO declared again the mpox as Public Health Emergency of International Concern (PHEIC) based on the detection of a new subclade (clade Ib) in Easter Democratic Republic of the Congo, which it is spreading rapidly and being detected in the neighbouring countries that has not previously reported mpox, and has the potential to extend outside Africa and beyond (WHO, 2024c).

The similarities in clinical symptoms between diseases caused by *orthopoxvirus* and other viral infections such as varicella-zoster virus make the diagnosis challenging (Chauhan et al., 2023). Real-time PCR assays are required for controlling outbreaks and reducing human-to-human transmission (Chauhan et al., 2023).

NOTE: to ease the comprehension, we will use the following abbreviations throughout the entire document:

- Mpox: Monkeypox disease (former nomenclature).
- MPXV: Monkeypox virus.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit is a non-automatized real-time PCR test designed for the qualitative detection of DNA from Monkeypox virus (MPXV), including Clades I and II, in lesion swabs. After DNA isolation, the identification of MPXV is performed by the amplification of a conserved region of the *G2R* and *F3L* genes, using specific primers and a fluorescent-labelled probes. This test may be performed using several validated workflows (see section 5), which allow for greater versatility and adaptability of use.

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 bound 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 all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilised¹ format. The assay uses a human housekeeping gene as an **Endogenous Internal Control (EIC)** (haemoglobin subunit beta gene, *HBB* gene) to follow-up the integrity of the sample, to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity. Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance

¹ Please note that both "stabilised", and "lyophilised" terms are used indistinguishable and as synonyms throughout the entire document.

and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels. If there is an improper collection, storage, and/or processing of the specimens, this control may become negative.

Moreover, this kit contains two additional controls: Positive Control (PC) and Negative Control (NC). The PC is a non-infectious synthetic DNA positive for the target under study to be used for the monitoring of the PCR amplification in each execution. On the other hand, the NC is used to detect unspecific amplifications during the amplification step. Please consult section 11. Quality control for further information.

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 products with Endogenous Internal Control (EIC) and in Annex 2 for Tube format products with Endogenous Internal Control (EIC).

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 $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- 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 , 100-1000 μL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments). Only for Rotor Gene format (Annex 1).
- Blank sample (See section 8.2 DNA extraction).

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit was tested with different workflows, although nine main workflows were selected to carry out the analytical and/or clinical evaluation and validation of the device. These instruments are considered as validated for the use of the VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit:

	Instruments
1	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) ²
2	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTPRime real-time PCR instrument (DNA-Technology)
3	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
4	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™)
5	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) ²
6	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + DTPRime real-time PCR instrument (DNA-Technology)
7	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
8	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™)
9	MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit, using the MagCore® automated nucleic acid extractors (RBC Bioscience) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) ²

Table 1. Extraction-amplification methods (workflows) validated using VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

The software and/or firmware versions used during the performance validation of the VIASURE kit were the following ones:

- Thermocyclers:
 - CFX Maestro 2.3 software, versions 5.0.021.0616 and 5.3.022.1030, in Bio-Rad instruments.
 - Realtime_PCR software, v7.9, specifically version 7.9.9.25 (last edition), in DNA-Technology thermocycler.
 - Rotor-Gene Q Series Software 2.3.5 (Build 1), used in Rotor-Gene® Q (QIAGEN) instrument.
 - 7500 Software v2.0.6, applied in the Applied Biosystems™ thermocycler.
- Automated extraction systems:
 - 1.0.3 firmware version 1.2A, belonging to the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
 - L0-0205-D008, included in the MagCore® automated nucleic acid extractors (RBC Bioscience).

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

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with VIASURE Real Time PCR Detection Kits. This assay has been validated with the following set exposition values:

² Both, the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) and the CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) are equivalent and have the same operating characteristics. The CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) thermocycler also has similar characteristics and can be considered equivalent.

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.

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

Samples selected for the evaluation of the device were lesion swabs collected with sterile synthetic fibre swabs with plastic placed immediately into a sterile transport tube containing Universal transport medium (UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) (workflows 1-8) or in Viral Transport Medium (-VTM- Virus Transport and Preservation Medium (Non-inactivated) (biocomma ®)) (workflow 9).

6. Transport, storage and use conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the kit label.
- Avoid vibrations during transport to prevent liquid leakage.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C until the expiration date stated on the kit label. It is recommended to separate it into aliquots (for instance, 4 aliquots of 25 µL each) to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- For Tube format kits: Once the *Monkeypox virus* Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept at 25±5°C or 4±2°C for up to 4 hours. For a longer period, it is recommended store at -20°C until the expiration date stated on the kit label. Reaction-Mix in tube format has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles. Once the tube has been opened/or rehydrated, it must be stored to keep the vial away from light.
- For Open format kits (strips and plates): For proper use of the kit, it is recommended not to rehydrate additional unused wells. If all the provided wells in an 8-well strip or 96-well plate are not used, the required number of reaction wells can be easily cut from 8-well strips or 96-well plates. If all wells are not used, it is recommended that unused wells are stored in the provided foil bags with the silica gel inside to prevent contact with light until use. The open bag with not rehydrated wells at 2-40°C is stable until the shelf life stated on the kit label.
- For strips and plates: Once the required wells are rehydrated, the addition of nucleic acid and performance of the Real-Time PCR must be carried out immediately.
- After nucleic acid extraction from the clinical sample, the eluted could be stored for up to 24 hours at 4-25°C or six months at -20°C prior to addition to the Real-Time PCR assay.

The following table summarises the conditions for transport, storage and use of the overall kit and each component:

Component	Transport Conditions	Storage Conditions	In-use conditions
Entire VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit.	2-40°C during the shelf life stated in the kit label.	Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label.	* See in-use conditions of each component.
<i>Monkeypox virus</i> well-strip or well plate (See Annex 1).		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Non-rehydrated wells in an open pouch with the silica gel: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature (18-31°C)*.
<i>Monkeypox virus</i> Reaction-Mix tube (see Annex 2).		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Rehydrated tube: 25±5°C or 4±2°C for up to 4 hours. For a longer period, store directly at -20°C during the shelf life stated in the kit label.	Immediate use at Room temperature (18-31°C)*.
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control vial		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Rehydrated control: -20°C during the shelf life stated in the kit label.	Immediate use at Room temperature (18-31°C)*.
Rehydration Buffer		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature (18-31°C)*.
Negative Control vial		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature (18-31°C)*.
Water RNase/DNase free vial		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature (18-31°C)*.

Table 2. Summary of the conditions for transport, storage and use of the VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit and each component.

* Room temperature = 18°C - 31°C. This range is established after performing tests where the ambient temperature conditions (at 30°C±2) and/or the exposure time of the reaction mixture to these temperatures (immediate use vs. 15 min) were modified before and after rehydration, both cases with the protective seal open. PCR amplification was performed at the ambient temperature established by the thermocycler manufacturers, corresponding to a range of 18°C-30°C.

7. Precautions for users

- 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 *in vitro* diagnostic procedures (including training on the Real-Time PCR instrument (thermocycler) and Nucleic acid extraction system).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Instructions for use must be read carefully before using the VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. Do not perform the PCR assay until the information about procedures, safety precautions and limitations described in the Instructions for use have been understood.
- 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.
- Once the protective aluminium seal has been removed from the plates or strips, or the tubes have been opened, the end user must use the plates, strips or tubes in the shortest time possible to protect the master mix from sunlight.
- Please note: In case the number of reactions required/needed is less than supplied on one strip or plate, before removing the protective seal, carefully cut out the required wells and store the rest inside the bag with the desiccant.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for references: VS-MPX113L, VS-MPX113H, VS-MPX136, and VS-MPX172). Remove any excess air in the pouches prior to closing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- To avoid label deterioration, do not use the product near solvents.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots and/or another supplier.
- Protect reagents against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-MPX101, VS-MPX136, and VS-MPX172 (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.
- Once the pouch of Positive Control or Reaction-Mixture in Tube format has been opened, rehydrate the vials immediately, use them in the PCR reaction or store them properly. It is not recommended to leave the vial open without resuspending, as this may cause deterioration of the reagent.
- Once the protective aluminium seal has been removed from the plate or strips, use them immediately for the Real-Time PCR (rehydrate the wells, add the samples, and place the strips/plate into the thermocycler). It is not recommended to leave the strips or plate open without resuspending. Likewise, once the required wells are rehydrated, the addition of nucleic acid and performance of the Real-Time PCR must be carried out immediately.
- 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 smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, 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. A statement declaring no requirement of Material Safety Data Sheet could be requested to Certest Biotec.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions, and procedures.
- Make sure that the configuration and conditions of the settings on the thermocycler is done following the instructions in the section 'PCR protocol' of Annexes 1 and 2 (DNA/RNA protocol, number of cycles, temperatures etc.).
- The certificate of analysis is not included with the device; however, it could be requested to Certest Biotec in case of need.

8. Test procedure

Please see Annex 1 for Open and Rotor-gene format products with Endogenous Internal Control Test Procedure and Annex 2 for Tube format products with Endogenous Internal Control Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit was tested using lesion swabs, including vesicles, pustules or scabs, collected with sterile synthetic fibre swabs with plastic placed immediately into

a sterile transport tube containing Universal transport medium (UTM® Universal Transport Medium™ (Copan)) or Viral Transport Medium (-VTM- Virus Transport and Preservation Medium (Non-inactivated) (biocomma®)), depending on the sample. Other types of samples must be validated by the user.

The equivalence between the use of Copan's UTM and biocomma's VTM for Monkeypox virus sample collection lies primarily in their functional roles as viral transport media. Both are designed to stabilise viral samples for diagnostic testing, particularly during transport from the collection site to the laboratory. UTM/VTM media generally consists of a balanced salt solution and antimicrobial agents to maintain viral integrity while preventing bacterial or fungal growth. The Copan's UTM has been widely validated and used for a range of viral pathogens, including MPXV, as it preserves the viability of viruses for molecular testing. Similarly, biocomma's VTM performs a comparable function, ensuring the preservation of viral nucleic acid, which is crucial for PCR-based diagnostic tests. Both media are designed to meet WHO and CDC guidelines for viral sample collection and transport.

Collection, storage, and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, clinical samples should be collected as soon as possible, during the acute phase of illness or at any time during the clinical course, and before a therapy begin, if possible. Specimens should be obtained by avoiding biological secretions that are not of interest, and subsequently collected in sterile, clean containers with or without transport media (depending on sample type). All specimens must be labelled with the name and identification number of the person from whom the specimen was collected, the source of the specimen, and the date and time it was collected. After collection, specimens should be placed in a biohazard bag and should be transported and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. Specimens submitted for molecular testing must be stored in controlled conditions so that nucleic acids do not degrade during storage. It is recommended to use fresh specimens for the test. For both transport (if necessary) and storage of clinical samples until processing, it should be considered the temperature at which they have to be stored and for how long (also following local and national regulations for transport of pathogenic material). In the case of lesion swab specimens, they should be maintained at 2 to 8°C for up to 7 days³, or frozen at -20°C or lower, ideally at -80°C, for conservation if time until processing exceeds 7 days³ (with a maximum of 2 freeze/thaw cycles).

The clinical specimens must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines and/or laboratory policy manuals. As example, refer to the *Guidelines for Collecting and Handling Specimens for Mpox Testing*. (<https://www.cdc.gov/mpox/hcp/diagnosis-testing/collecting-specimens.html>).

Please note: Specimen collection, transport, and storage conditions indicated above are suggested based on the recommendations for lesion swabs (collected in transport medium (UTM or VTM)) intended to be used for nucleic acid detection, which appear in the referenced CDC guidelines. Nevertheless, we

³ *Guidelines for Collecting and Handling Specimens for Mpox Testing*. (<https://www.cdc.gov/mpox/hcp/diagnosis-testing/collecting-specimens.html>).

recommend following laboratory guidelines, and/or microbiology laboratory policy manual for proper transport and preservation of samples^{3,4}.

An internal specimen stability study was conducted with VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit, using contrived lesion swabs (negative skin lesion swabs in UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) spiked with MXPV) at two different concentrations (2xLoD and 5xLoD). Samples were examined at 24, 48 and 168 hours after being stored at 4°C±2°C, and at 24 hours after being maintained at 25°C±2°C. Results showed a good performance of samples stored at all conditions tested, meeting the acceptance criteria initially stated and complying with the sample storage criteria recommended by the CDC guidelines.

8.2. DNA extraction

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

Please note: Positive and Negative control must not be extracted. However, to monitor or control the extraction process and discard possible contaminations, a blank sample (not provided in the kit) could be extracted following the same procedure used for clinical sample. Blank sample should consist of the same matrix (real or simulated) as clinical samples, previously characterized as negative for all targets.

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit was validated with lesion swabs collected in UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) extracted with MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) or QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), and analysed on CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology), Rotor®-Gene Q (QIAGEN) or 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™). In addition to these workflows, VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit was validated with lesion swabs collected in VTM Virus Transport and Preservation Medium (Non-inactivated) (biocomma ®), extracted with MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit / MagCore® automated nucleic acid extractors (RBC Bioscience) and analysed on CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

In case of using a different workflow than those mentioned above, the validation of the new workflow shall be performed by the end-user following the manufacturer's instructions for use.

⁴ [Surveillance, case investigation and contact tracing for Monkeypox: Interim guidance \(who.int\)](https://www.who.int/publications-detail/surveillance-case-investigation-and-contact-tracing-for-monkeypox-interim-guidance)

9. Result interpretation

9.1. References with internal control (references in Annexes 1 and 2)

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. The threshold must be established in each run. Please, if your equipment sets the threshold automatically, check and verify that it adjusts to the positive control or adjust it manually. For each channel, select the well corresponding the positive control, and fix the threshold within the exponential phase of the fluorescence curve and above any background signal (below the baseline). Once the threshold has been established, the rest of the samples of the same run can be interpreted.

The threshold value of the different channels could be different due to the chemical nature of the different fluorophores. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

It is also recommended to include a blank, consisting of a confirmed negative sample (the same matrix as tested samples) for the targets detected in order to set the baseline of the assay.

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

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

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

Table 3. Expected Performance of Controls. Ct values. no signal = no amplification curves.

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 the 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, **select in the thermocycler only the channels where targets are detected**. Then, use the following table, read, and analyse the results:

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

Table 4. Interpretation of individual patient sample results. Ct values no signal = no amplification curves.

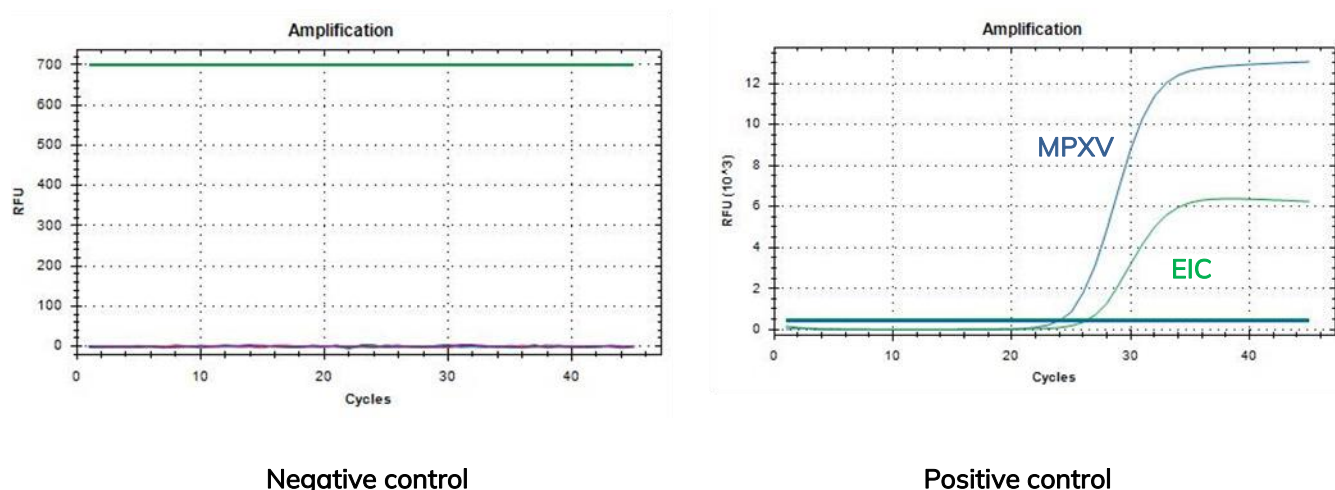
1 The Endogenous Internal Control (EIC) must show an amplification signal (Ct ≤40). The endogenous internal control is a human housekeeping gene that is presented in all nucleated cells. In case the target shows an amplification signal and the Endogenous Internal Control does not show any, the reaction should be considered 'Invalid' and it is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 following the laboratory guidelines and/or microbiology laboratory policy manuals. Ct values between 35-40 may indicate suboptimal sample collection, storage, and/or processing, so test repetition with recollected and/or reprocessed samples may be considered based on clinical judgement.

2 In the case of MPXV target genes negative, EIC must show an amplification signal with Ct ≤ 40. The Ct value could be very variable due to the Endogenous Internal Control is a human housekeeping gene that is present in all human nucleated cells in the original samples. If there is an absence of signal or Ct value > 40 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, following the laboratory guidelines and/or microbiology laboratory policy manuals. Possible causes of a Ct value > 40 of the Endogenous Internal Control might be improper collection, storage, and/or processing of the specimens, failure of one or more of the reagents or the PCR thermal cycling process, as well as the presence of inhibitors.

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:

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

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests.
- The Endogenous Internal Control (EIC) must show an amplification signal ($Ct \leq 40$). Ct values between 35-40 may indicate suboptimal sample collection, storage, and/or processing, so test repetition with recollected and/or reprocessed samples may be considered based on clinical judgement.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with DNA extracted from lesion swabs.
- Possible crosstalk might be observed in empty channels of the thermocycler if there is no target to be detected, so it is required to select only the channels where these are amplified when interpretation of results is performed. Please contact to viasuresupport@certest.es for any queries.
- When using Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments, only one VIASURE product must be used at a time to avoid potential crosstalk between channels. Please contact to viasuresupport@certest.es for any queries.
- The operational use of this product has been validated only within the recommended temperature range of 18–31 °C, which aligns with the operational specifications of commonly used real-time PCR thermocyclers (consult Table 2). In case of using a different temperature condition, the validation of the new operational temperature shall be performed by the end-user.
- 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. It is not possible to correlate the Ct values obtained by PCR with the concentration of the sample as they depend on the thermocycler used and the run itself.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.

- Please note the intended measurement range of the assay, as samples with concentrations above or below this range may give erroneous results.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by MPXV, either by *Monkeypox virus* Positive Control, 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 DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown MPXV clades.
 - A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of Real-Time PCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, some antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - The effect of interfering substances has only been evaluated for those indicated in section 12.5.1 of this Instructions for Use (Interferences and inhibitors of PCR section). Please, see this section to check the most common endogenous and exogenous substances that induce a total or partial interference of Real-Time PCR reaction. Other substances not indicated in this part could lead to erroneous results.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Potential microbial interference from the orthopoxviruses Camelpox and Variola could be obtained, since $\geq 80\%$ homology with one of the two targets detected with VIASURE assay is observed. The results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of virus incidence, clinical symptoms, and other diagnostic tests.
- *In silico* analysis showed $\geq 80\%$ sequence homology with certain *Lactobacillus species*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Nevertheless, based on analytical, biological, and epidemiological plausibility assessments, the likelihood of non-specific amplification leading to interference is considered very low and acceptable. Consult section 12.5.1 Analytical specificity for more information.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable viruses 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 targeted viral sequences.
- Negative results do not preclude MPXV 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 MPXV have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the virus.

- If diagnostic tests for other poxvirus-related illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that MPXV 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 (even being the same model), extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.
- Positive control and Negative control must not be extracted, but a blank sample is recommended to be included throughout the extraction and qPCR workflow to discard possible contaminations. Potential false positive results might remain undetected if blank sample is omitted.
- Some samples may fail to exhibit *HBB* amplification curves due to low human cell number in the original clinical sample. A negative EIC signal does not preclude the presence of MPXV in clinical specimens.

11. Quality control

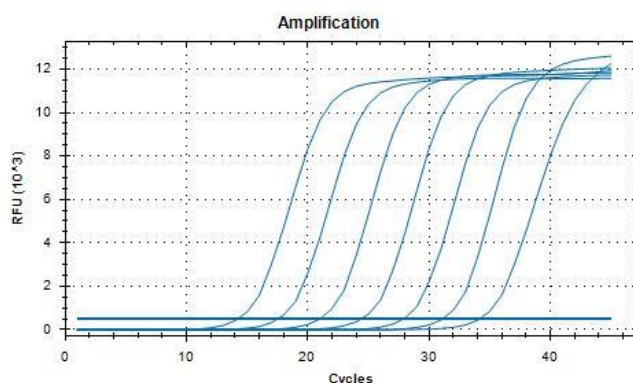
VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. The Positive Control (PC) is a non-infectious synthetic DNA positive for the target under study to be used for the monitoring of the PCR amplification in each execution. The use of the PC is solely intended for amplification control purposes and has no quantitative objective. PC might not amplify due to the PCR inhibition by the presence of an artifact/inhibitor, due to a failure of one or more of the reagents or at the well-rehydration step, or because of a failure at the PCR thermal cycling process. Thus, if the PC does not amplify, the run is invalidated. On the other hand, the Negative Control (NC) is used to detect unspecific amplifications during the amplification step. If amplifications are observed, the run is invalidated. Finally, the Endogenous Internal Control (EIC) in each well confirms the correct performance of the technique and the extraction process, and its presence approves the quality and the integrity of the sample processing. A negative EIC indicates that no human DNA is present in the sample owing to insufficient sample collection or due to an improper sample collection, storage, and/or processing.

12. Analytical performance characteristics

12.1. Analytical linearity

The linearity of the assay was determined and confirmed by testing a series of ten-fold dilutions containing a known concentration (ranging from 10^7 to 10^1 copies per reaction, that is, from 2×10^9 to 2×10^3 copies/mL) of specific and synthetic DNA belonging to MPXV. Example of the amplification plot resulting from an assay run on the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) is included below:

Figure 2. Dilution series of MPXV (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel FAM).



The linearity was also tested on DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology), Rotor-Gene® Q (QIAGEN) and 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™) with series of ten-fold dilutions containing a known concentration (ranging from 10^7 to 10^1 copies per reaction (2×10^9 to 2×10^3 copies/mL)) of specific and synthetic DNA belonging to MPXV. Results lead to confirm that the linearity, linear regression, efficiency and level of detection observed for the target detected with VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit, using the four thermocyclers mentioned, meet the acceptance criteria.

12.2. Analytical sensitivity. Limit of Detection (LoD)

Analytical sensitivity or limit of detection (LoD) of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit was analysed using skin lesion swabs in Copan®'s UTM (for workflows 1-8), and skin lesion swabs in biocomma®'s VTM (workflow 9), spiked with reference material of MPXV. Samples were extracted and analysed following nine workflows:

	Extraction	Amplification
1	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
2	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology)
3	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
4	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™)
5	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
6	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)	DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology)
7	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)	Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
8	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)	7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™)
9	MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit / MagCore® automated nucleic acid extractors (RBC Bioscience)	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Table 5. Extraction and amplification methods (workflows) validated using VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit showed an experimental detection limit indicated in the following table, with a positive rate of $\geq 95\%$:

skin lesion swabs in Copan®'s UTM								skin lesion swabs in biocomma®'s VTM
Workflow 1	Workflow 2	Workflow 3	Workflow 4	Workflow 5	Workflow 6	Workflow 7	Workflow 8	Workflow 9
MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV
25 copies/mL	50 copies/mL	50 copies/mL	25 copies/mL	25 copies/mL	50 copies/mL	25 copies/mL	50 copies/mL	15 copies/mL

Table 6. Experimental LoD results of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit using nine workflows and skin lesion swabs in Copan®'s UTM or biocomma®'s VTM spiked with reference material for MPXV.

After using the Probit Model to analyse the results, VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit showed the detection limit indicated in the following table, with a positive rate of $\geq 95\%$:

skin lesion swabs in Copan®'s UTM								skin lesion swabs in biocomma®'s VTM
Workflow 1	Workflow 2	Workflow 3	Workflow 4	Workflow 5	Workflow 6	Workflow 7	Workflow 8	Workflow 9
MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV
14 copies/mL	28 copies/mL	48 copies/mL	23 copies/mL	24 copies/mL	32 copies/mL	23 copies/mL	28 copies/mL	14 copies/mL

Table 7. LoD results of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit obtained after Probit analysis, using nine workflows and skin lesion swabs in Copan®'s UTM or biocomma®'s VTM spiked with reference material for MPXV.

The obtained LoDs per workflow comply with the acceptance criteria initially stated. Nevertheless, experimental LoDs were considered as reference for the rest of performance analyses.

12.3. Measuring range

The measuring range of the assay was determined by testing a series of ten-fold dilutions containing a known concentration of specific and synthetic DNA belonging to MPXV, and further refined with the LoD assay. Results allowed to confirm the correct detection of the target from 2×10^9 copies/mL 25 copies/mL, complying with the acceptance validation criteria initially stated.

12.4. Accuracy

12.4.1. Trueness (Veracity)

The veracity of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit was evaluated by testing reference material listed below. Reference strain were extracted with MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), and analysed with the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) and the DTPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology). In the case of reference DNA/RNA, they were directly analysed with the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) or the DTPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology).

1. Synthetic DNA fragments:

- Name of synthetic DNA fragment for MPXV (*GR2* gene): MPXXPC, FAM channel.
- Name of synthetic DNA fragment for MPXV (*F3L* gene): MPXXPC, FAM channel.

2. ZeptoMetrix Corporation:

- NATtrol™ Monkeypox Virus External Run Control, isolate USA/MA001/2022* (ZeptoMetrix Ref: NATMPXV-ERC).

* This reagent was deposited by the Centers for Disease Control and Prevention and obtained through BEI Resources, NIAID, NIH: Monkeypox Virus, hMPXV/USA/MA001/2022 (Lineage B.1, Clade IIb), NR-58622.

3. Control materials:

External Reference	Pathogen Name	Variety
MBC146-R	AMPLIRUN® MONKEYPOX VIRUS DNA CONTROL	West African clade

Table 8. Monkeypox virus reference material from Vircell S.L.

4. EQA Programmes

Procedence	Pathogen Name	Samples correctly detected
QCMD 2022 and 2023 Poxviruses EQA Pilot Study	Monkeypox Clade I (Congo Basin clade /Central African isolate)	POX22S2-01, POX22S2-06, POX22S2-07, POX22S2-08, POX22S2-10, POX23C1A-01, POX23C1A-04, POX23C1A-05, POX23C1A-07, POX23C1B-07 and POX23C1B-10
QCMD 2022 and 2023 Poxviruses EQA Pilot Study	Monkeypox Clade IIb (West African clade/2022 outbreak isolate)	POX22S2-03, POX22S2-04, POX23C1A-03, POX23C1A-09, POX23C1A-10, POX23C1B-02, POX23C1B-04, POX23C1B-05, POX23C1B-08 and POX23C1B-09

Table 9. Reference material from EQA programmes.

12.4.2. Precision

To determine the precision of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit, intra-assay (repeatability), inter-assay, inter-batch, and inter-thermocycler assays (reproducibility) were performed. The panel of samples were analysed following the workflow MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) / DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology).

Intra-assay

The intra-assay was tested by analysing replicates of all samples in the same run using VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit and the selected workflow. The following table shows the results obtained in this assay.

Sample	Target	Viasure channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positive 1 (6xLoD)	MPXV	FAM	32.14	0.32	1.01
Positive 2 (3xLoD)	MPXV	FAM	33.48	0.50	1.49
Negative sample	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	HEX	26.56	0.27	1.00
Positive Control	MPXV	FAM	24.30	0.09	0.38
Negative Control	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	HEX	Neg	n.a.	n.a.

Table 10. Intra-assay results of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Inter-assay

The inter-assay was tested by analysing the different samples on three different days by three different operators with the VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit run on DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology). A summary of results is shown in the table below.

Sample	Target	Viasure channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positive 1 (6xLoD)	MPXV	FAM	32.59	0.52	1.61
Positive 2 (3xLoD)	MPXV	FAM	33.33	0.30	0.89
Negative sample	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	HEX	26.66	0.71	2.67
Positive Control	MPXV	FAM	24.40	0.20	0.81
Negative Control	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	HEX	Neg	n.a.	n.a.

Table 11. Inter-assay results of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Inter-batch

The inter-batch values were determined with three replicates of the different samples by using three batches of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit, run on DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology). The results are described below in the following table.

Sample	Target	Viasure channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positive 1 (6xLoD)	MPXV	FAM	32.30	0.58	1.79
Positive 2 (3xLoD)	MPXV	FAM	33.42	0.48	1.43
Negative sample	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	HEX	26.86	0.45	1.67
Positive Control	MPXV	FAM	24.46	0.40	1.65
Negative Control	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	HEX	Neg	n.a.	n.a.

Table 12. Inter-batch results of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Inter-thermocycler

The inter-thermocycler values were determined with three replicates of the same samples used for intra-assay, inter-assay and inter-batch assay, using the VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection

Kit. The DNA extracted from samples and positive and negative controls were tested all together in the same run, on CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™) and DTPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology). The results are described below in the following table.

Sample	Target	Viasure channel	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positive 1 (6xLoD)	MPXV	FAM	32.19	0.26	0.82
Positive 2 (3xLoD)	MPXV	FAM	33.13	0.31	0.95
Negative sample	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	HEX	26.51	0.69	2.61
Positive Control	MPXV	FAM	24.41	0.26	1.05
Negative Control	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	HEX	Neg	n.a.	n.a.

Table 13. Inter-thermocycler results of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

12.4.3. Accuracy

The accuracy of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit was determined considering the combination of the trueness and precision properties. Taking the obtained data of the precision experiment for the 3xLoD concentration point as reference of the expected Ct values (Trueness), 3 different batches were used to test samples at the same concentration used in precision assays. A total of 180 data points (Precision) were analysed: three runs were performed in three different thermocyclers, and in each run, a total of 60 replicates (20 replicates amplified per batch) were included. Samples were extracted with MagDEA DX SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and analysed with the CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™) and DTPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology).

Sample	Target	Viasure channel	Accuracy reference values (Trueness)			Accuracy results (Precision)		
			$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Sample 1 (3xLoD)	MPXV	FAM	32.40	0.50	1.55	32.85	0.35	1.05

Table 14. Accuracy results in comparison to accuracy reference values (precision assay results → Trueness) of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

The results obtained showed that the mean Ct value obtained from the 180 replicates was within the corresponding range of the mean Ct value obtained in the precision experiments $\pm$ the standard deviation for the target in study. In addition to this, the deviation and the variation coefficient meet the acceptance requirements.

12.5. Analytical specificity and reactivity

The analytical specificity and analytical reactivity were evaluated for the VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit *in silico* and experimentally, using different starting material such as certified reference strains, certified reference RNA/DNAs and material from the EQAs programmes.

12.5.1. Analytical specificity

Analytical specificity is the assay's ability to detect the intended target. There are two components to be considered for analytical specificity: Cross-reactivity and Interference. Cross-reactivity may occur when genetically related genes/sequences are present in a patient specimen, while interference may happen if the presence of specific substances potentially present in the sample matrixes affects the performance of the qPCR.

Cross-reactivity *in silico* analysis

The cross-reactivity was assessed by using sequences of other microorganisms related, but different from the detected target. Sequences downloaded from the NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) were evaluated, while alignment of primers and probes were performed with BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and an in-house bioinformatic analysis software. Results shown below only indicate sequences with a homology percentage higher than 80%. Aligned sequences with a percentage of alignment less than 80% of homology were considered unlikely to be detected. The most relevant results are shown in the following table:

Microorganism	ID Reference in NCBI or RefSeq number	% Homology
Borealpox virus ^a	MN240300	85%
Camelpox virus ^b	KC841322, KC841321, KC841320, KC841319, U87839, U87837, U87838, U87840	91.25%
Cowpox virus ^c	OM460002	97.26%
	LT896721, LR812035	95.89%
	KY549148, KY549144, HQ420900	94.52%
	KC813494, KC813493, FJ769342, FJ769341, FJ769340, FJ769339, FJ769337, AY623479, U90235, U90234, U90233, U90231, U90228, KY569019, KC813505, KC813496, FJ769336, U90227, U90226, KY549147, KY549146, KU861504, KC813510, KC813503	91.25%
	KC813509, KC813495, KC813492, KC813491, HQ328780, U90232, U90230, U90229, U90225, KC813506, KC813498, KC813497, FJ769338, KY549151	90%
Taterapox virus ^d	U86874	93.33%
Vaccinia virus ^e	MN369532, BK013340	90%
Variola major virus ^f	L22579	93.51%
Variola minor virus ^g	Y16780	93.51%
Variola virus ^h	LR800245, LR800244	94.81%
	BK010317, LT706529, LT706528, KY358055, NC_001611, OL468962, OL468961, DQ437592, DQ437591, DQ437590, DQ437589, DQ437588, DQ437587, DQ437586, DQ437585, DQ437584, DQ437583, DQ437582,	93.51%

	DQ437581, DQ437580, DQ441448, DQ441447, DQ441446, DQ441445, DQ441444, DQ441443, DQ441442, DQ441441, DQ441440, DQ441439, DQ441438, DQ441437, DQ441436, DQ441435, DQ441434, DQ441433, DQ441432, DQ441431, DQ441430, DQ441429, DQ441428, DQ441427, DQ441426, DQ441425, DQ441424, DQ441423, DQ441421, DQ441420, DQ441419, DQ441418, DQ441417, DQ441416, X70841, U18341, U18339, X67117, X69198, U88152, U88151, U88150, U88148, U88147, U88146, U88145	
	LR800247, LR800246	92.21%

Table 15. Percentage of homology of Monkeypox virus primers and probe set in the cross-reactivity analysis, comparing reference sequences of Monkeypox virus-like pathogens from the NCBI database.

^a In the case of the Borealex virus (formerly Alaskapox), the detected sequence is the only Borealex virus sequence available in the NCBI Nucleotide database, and aligns with a very low homology against the monkeypox detection primers and probe set, being its detection very unlikely. Moreover, only a few cases of borealex have been confirmed, with no evidence of human-to-human infection⁵. However, the possible detection of the pathogen has been analysed experimentally by testing a series of ten-fold dilutions containing a known concentration (ranging from 10⁷ to 10¹ copies per reaction) of specific and synthetic DNAs belonging to the mismatches observed in the Borealex virus sequences, and results obtained showed that VIASURE assay barely detects Borealex virus, discarding possible cross-reactivity issues.

^b Relating to Camelpox disease, the virus responsible of this condition is usually restricted to camels ^{6,7}, affecting humans only in punctual cases, with no reported human-to-human transmission.

^{c,d} Sporadic cases of Cowpox⁸ and Taterapox⁹ have been reported in Europe, mostly linked to handling infected animals, usually rodents and cats. There is not known evidence of human-to-human transmission. In addition, in the case of the Cowpox virus it was verified the non-detection in a wet analysis conducted with the human-like specimen containing the Cowpox, OPV 88-Lunge (indicated in section “Cross-reactivity wet testing”).

^e Vaccinia virus is the pathogen used for the smallpox vaccine, being responsible of its eradication. Therefore, human cases are extremely rare, with no human-to-human infections notified ^{10,11}. Again, the non-detection of this virus was verified in a wet analysis conducted with a human-like specimen containing the Vaccinia virus, Elstree (indicated in section “Cross-reactivity wet testing”).

⁵ Borealex. (n.d.). Retrieved April 18, 2024, from <https://health.alaska.gov/dph/Epi/id/Pages/Borealex.aspx>

⁶ Balamurugan V, Venkatesan G, Bhanuprakash V, Singh RK. Camelpox, an emerging orthopox viral disease. Indian J Virol. 2013 Dec;24(3):295-305. doi: 10.1007/s13337-013-0145-0. Epub 2013 Jul 16. PMID: 24426291; PMCID: PMC3832703.

⁷ Dahiya, S. S., Kumar, S., Mehta, S. C., Narnaware, S. D., Singh, R., & Tuteja, F. C. (2016). Camelpox: A brief review on its epidemiology, current status and challenges. Acta tropica, 158, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.014>

⁸ Krankowska, D. C., Woźniak, P. A., Cybula, A., Izdebska, J., Suchacz, M., Samelska, K., Wiercińska-Drapała, A., & Szaflik, J. P. (2021). Cowpox: How dangerous could it be for humans? Case report. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases, 104, 239–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.061>

⁹ Parker, S., Crump, R., Hartzler, H., & Buller, R. M. (2017). Evaluation of Taterapox Virus in Small Animals. Viruses, 9(8), 203. <https://doi.org/10.3390/v9080203>

¹⁰ Xiang, Y., & Lane, R. K. (2021). Vaccinia Virus (Poxviridae). Encyclopedia of Virology: Volume 1-5, Fourth Edition, 1–5, 854–859. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00047-3>

¹¹ Henderson D. A. (2011). The eradication of smallpox--an overview of the past, present, and future. Vaccine, 29 Suppl 4,D7–D9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.080>

^{f,g,h} Finally, Smallpox (Variola virus) was declared eradicated (eliminated) by the World Health Assembly in 1980, and no cases of naturally occurring smallpox have happened since ¹².

A more detailed information about sequences homologies $\geq 80\%$ with the forward, reverse and probe oligonucleotides included in VIASURE reaction mix can be found in the following tables. Table 16 includes the organisms that align with the forward, reverse and probe oligonucleotides for the G2R target detection with a percentage of alignment higher than 80%, but with a homology percentage lower than 80% with the forward, reverse and probe oligonucleotides for the F3L target detection (data not shown). Table 17 shows the list of organisms that align with both sets of primers and probe for the *G2R* and *F3L* target detection with a percentage of alignment higher than 80%. Finally, Table 18 includes the analysed microorganisms and its percentage of alignment (homology) with G2R forward, G2R reverse, G2R probe, F3L forward, F3L reverse and F3L probe with a percentage greater than 80%. Please note that PCR amplification is expected only if the three oligonucleotides belonging to one set (F3L set or G2R set) achieve a percentage of homology greater than 80%, and/or if the amplicon is lower than 500 nucleotides. If not, cross-reactivity can be discarded.

FASTA Name	Homology <i>G2R</i> target- Forward (%)	Homology <i>G2R</i> target- probe (%)	Homology <i>G2R</i> target- reverse (%)	Total Homology (%)
AY623479.1 Cowpox virus strain CoPV/DEN/98 tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, complete cds	96.15	83.33	95.83	91.25
BK010317.1 TPA_asm: Variola virus isolate VD21, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
BK013340.1 TPA_asm: Vaccinia virus isolate VK02, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
DQ437580.1 Variola virus strain Afghanistan 1970 Variolator 4, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ437581.1 Variola virus strain Bangladesh 1975 v75-550 Banu, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ437582.1 Variola virus strain China Horn 1948, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ437583.1 Variola virus strain Congo 1970, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ437584.1 Variola virus strain Germany 1958 Heidelberg, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ437585.1 Variola virus strain India 1964 7124 Vellore, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ437586.1 Variola virus strain India 1964 7125 Vellore, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ437587.1 Variola virus strain Iran 1972 2602 Tabriz, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ437588.1 Variola virus strain Nepal 1973, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ437589.1 Variola virus strain Pakistan 1969 (Rafiq Lahore), complete sequence	88.46	86.67	100	91.25
DQ437590.1 Variola virus strain Somalia 1977, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ437591.1 Variola virus strain Sumatra 1970 V70-222, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ437592.1 Variola virus strain Syria 1972 V72-199, complete genome	88.46	86.67	100	91.25

¹² <https://www.cdc.gov/smallpox/index.html>

DQ441416.1 Variola virus strain Benin, Dahomey 1968 (v68-59), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441417.1 Variola virus strain Botswana 1972 (v72-143), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441418.1 Variola virus strain Botswana 1973 (v73-225), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441419.1 Variola virus strain Brazil 1966 (v66-39 Sao Paulo), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441420.1 Variola virus strain Bangladesh 1974 (nur islam), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441421.1 Variola virus strain Bangladesh 1974 (Shahzaman), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441423.1 Variola virus strain Congo 9 1970 (v74-227 Gispen), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441424.1 Variola virus strain Ethiopia 1972 (Eth16 R14-1X-72 Addis), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441425.1 Variola virus strain Ethiopia 1972 (Eth17 R14-1X-72 Addis), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441426.1 Variola virus strain Guinea 1969 (005), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441427.1 Variola virus strain India 1953 (Kali-Muthu-M50 Madras), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441428.1 Variola virus strain India 1953 (New Delhi), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441429.1 Variola virus strain Japan 1946 (Yamada MS-2(A) Tokyo), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441430.1 Variola virus strain Japan 1951 (Harper, Masterseed), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441431.1 Variola virus strain Japan 1951 (Stillwell, Masterseed), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441432.1 Variola virus strain Korea 1947 (Lee, Masterseed), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441433.1 Variola virus strain Kuwait 1967 (K1629), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441434.1 Variola virus strain Niger 1969 (001, importation from Nigeria), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441435.1 Variola virus strain South Africa 1965 (102 Natal, Ingwavuma), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441436.1 Variola virus strain South Africa 1965 (103 T'vaal, Nelspruit), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441437.1 Variola virus strain Sierra Leone 1969 (V68-258), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441438.1 Variola virus strain Somalia 1977 (V77-1252), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441439.1 Variola virus strain Somalia 1977 (V77-1605), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441440.1 Variola virus strain Sudan 1947 (Juba), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441441.1 Variola virus strain Sudan 1947 (Rumbec), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441442.1 Variola virus strain Sumatra 1970 V70-228, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441443.1 Variola virus strain Tanzania 1965 kembula, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441444.1 Variola virus strain United Kingdom 1946 Harvey, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441445.1 Variola virus strain United Kingdom 1946 Hinden (Middlesex), complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441446.1 Variola virus strain United Kingdom 1947 Higgins (Staffordshire), complete genome	88.46	86.67	100	91.25

DQ441447.1 Variola virus strain United Kingdom 1952 Butler, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
DQ441448.1 Variola virus strain Yugoslavia 1972 V72-164, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
FJ769336.1 Cowpox virus isolate FIN/T2000 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	92.31	83.33	95.83	90
FJ769337.1 Cowpox virus isolate No-H2 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	96.15	83.33	95.83	91.25
FJ769338.1 Cowpox virus isolate No-F1 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	92.31	83.33	95.83	90
FJ769339.1 Cowpox virus isolate No-F2 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	96.15	83.33	95.83	91.25
FJ769340.1 Cowpox virus isolate No-H1 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	96.15	83.33	95.83	91.25
FJ769341.1 Cowpox virus isolate Swe-H1 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	96.15	83.33	95.83	91.25
FJ769342.1 Cowpox virus isolate Swe-H2 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	96.15	83.33	95.83	91.25
HQ328780.1 Cowpox virus isolate IT-Llama09 tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, partial cds	92.31	83.33	95.83	90
KC813491.1 Cowpox virus strain BeaBer04/1, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KC813492.1 Cowpox virus strain HumLan08/1, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KC813493.1 Cowpox virus strain HumLit08/1, complete genome	96.15	83.33	95.83	91.25
KC813494.1 Cowpox virus strain HumLue09/1, complete genome	96.15	83.33	95.83	91.25
KC813495.1 Cowpox virus strain HumMag07/1, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KC813496.1 Cowpox virus strain HumPad07/1, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KC813497.1 Cowpox virus strain JagKre08/1, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KC813498.1 Cowpox virus strain JagKre08/2, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KC813503.1 Cowpox virus strain RatGer09/1, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KC813505.1 Cowpox virus strain RatKre08/2, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KC813506.1 Cowpox virus strain CatPot07/1, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KC813509.1 Cowpox virus strain HumBer07/1, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KC813510.1 Cowpox virus strain HumGra07/1, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KC841319.1 Camelpox virus isolate CMLV-DELHI tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, complete cds	92.31	86.67	95.83	91.25
KC841320.1 Camelpox virus isolate CMLV-BIKANER tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, complete cds	92.31	86.67	95.83	91.25
KC841321.1 Camelpox virus isolate CMLV-BARMER tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, complete cds	92.31	86.67	95.83	91.25
KC841322.1 Camelpox virus isolate CMLV-JAISALMER tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, complete cds	92.31	86.67	95.83	91.25
KU861504.1 Cowpox virus isolate Kostroma/2015 cytokine response modifier B gene, complete cds	92.31	86.67	95.83	91.25
KY358055.1 Variola virus strain VD21, 17th century, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
KY549146.1 Cowpox virus isolate CPXV_K779, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KY549147.1 Cowpox virus isolate CPXV_K780, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KY549151.1 Cowpox virus isolate Norwayfeline, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
KY569019.1 Cowpox virus strain CPXV CheNova_DK_2014, complete genome	96.15	83.33	95.83	91.25
L22579.1 Variola major virus (strain Bangladesh-1975) complete genome	88.46	86.67	100	91.25

LR800244.1 Variola virus genome assembly, complete genome: monopartite	92.31	86.67	100	92.5
LR800245.1 Variola virus genome assembly, complete genome: monopartite	92.31	86.67	100	92.5
LR800246.1 Variola virus genome assembly, complete genome: monopartite	88.46	86.67	95.83	90
LR800247.1 Variola virus genome assembly, complete genome: monopartite	88.46	86.67	95.83	90
LT706528.1 Variola virus isolate VARV_V563 genome assembly, chromosome: I	88.46	86.67	100	91.25
LT706529.1 Variola virus isolate VARV_V1588 genome assembly, chromosome: I	88.46	86.67	100	91.25
MN240300.1 Boreapox virus, complete genome	88.46	80	87.5	85
MN369532.1 Vaccinia virus isolate VK01, complete genome	92.31	83.33	95.83	90
NC_001611.1 Variola virus, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
OL468961.1 Variola virus strain GHA68, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
OL468962.1 Variola virus strain Congo 1970 v70-60, complete genome	88.46	86.67	100	91.25
U18339.1 Variola virus Garcia-1966 right near-terminal region	88.46	86.67	100	91.25
U18341.1 Variola virus Somalia-1977 right near-terminal region	88.46	86.67	100	91.25
U86874.1 Taterapox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (crmB) gene, complete cds	92.31	86.67	91.67	90
U87837.1 Camelpox virus strain Somalia-1978 tumor necrosis factor receptor II homolog (crmB) gene, complete cds	92.31	86.67	95.83	91.25
U87838.1 Camelpox virus CP1 tumor necrosis factor receptor II homolog (crmB) gene, complete cds	92.31	86.67	95.83	91.25
U87839.1 Camelpox virus strain Saudi-M3, tumor necrosis factor receptor II homolog (crmB) gene, complete cds	92.31	86.67	95.83	91.25
U87840.1 Camelpox virus CP5 tumor necrosis factor receptor II homolog (crmB) gene, complete cds	92.31	86.67	95.83	91.25
U88145.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88.46	86.67	100	91.25
U88146.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88.46	86.67	100	91.25
U88147.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88.46	86.67	100	91.25
U88148.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88.46	86.67	100	91.25
U88150.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88.46	86.67	100	91.25
U88151.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88.46	86.67	100	91.25
U88152.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88.46	86.67	100	91.25
U90225.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92.31	83.33	95.83	90
U90226.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92.31	83.33	95.83	90
U90227.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92.31	83.33	95.83	90
U90228.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	96.15	83.33	95.83	91.25
U90229.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92.31	83.33	95.83	90
U90230.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92.31	83.33	95.83	90

U90231.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	96.15	83.33	95.83	91.25
U90232.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92.31	83.33	95.83	90
U90233.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	96.15	83.33	95.83	91.25
U90234.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	96.15	83.33	95.83	91.25
U90235.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	96.15	83.33	95.83	91.25
X67117.1 Variola virus (XhoI-F,O,H,P,Q genome fragment) genes	88.46	86.67	100	91.25
X69198.1 Variola virus DNA complete genome	88.46	86.67	100	91.25
X70841.1 Variola virus genes for ORF1R, ORF2R and ORF3R	88.46	86.67	100	91.25
Y16780.1 variola minor virus complete genome	88.46	86.67	100	91.25

Table 16. Percentage homology of forward, reverse and probe for the *G2R* target detection (VIASURE Monkeypox Virus Real Time PCR Detection Kit) of the aligned sequences (>80%).

FASTA Name	Homology <i>G2R</i> target-forward (%)	Homology <i>G2R</i> target - probe (%)	Homology <i>G2R</i> target - reverse (%)	Homology <i>F3L</i> target - forward (%)	Homology <i>F3L</i> target - probe (%)	Homology <i>F3L</i> target-reverse (%)
HQ420900.1 Cowpox virus strain UK2000_K2984, complete genome	92.31	86.67	95.83	100.00	92.00	91.30
KY549144.1 Cowpox virus isolate CPXV_Catpox5wv1, complete genome	92.31	86.67	95.83	100.00	92.00	91.30
KY549148.1 Cowpox virus isolate CPXV_1639, complete genome	92.31	86.67	95.83	100.00	92.00	91.30
LR812035.1 Cowpox virus isolate GerMygEK 938/17 genome assembly, complete genome: monopartite	96.15	83.33	95.83	96.00	96.00	95.65
LT896721.1 Cowpox virus isolate Ger 2010 MKY genome assembly, complete genome: monopartite	96.15	83.33	95.83	96.00	96.00	95.65
OM460002.1 Cowpox virus isolate No-H2, complete genome	96.15	83.33	95.83	100.00	96.00	95.65

Table 17. Percentage homology of forward, reverse and probe for the *G2R* and *F3L* target detection (VIASURE Monkeypox Virus Real Time PCR Detection Kit) of the aligned sequences (>80%).

Pathogens/microorganisms	Taxonomy ID	Accession ID	<i>F3L</i> gene-FWD/ *	<i>F3L</i> gene-RV/ *	<i>F3L</i> gene-Probe/ *	<i>G2R</i> gene-FWD/ *	<i>G2R</i> gene-RV/ *	<i>G2R</i> gene-Probe/ *
Variola virus (smallpox)	10255	NC_001611.1	NA	86.96 %	80.00 %	88.46 %	100%	86.67 %
Molluscum contagiosum virus	10280	NC_001731.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Parapoxvirus (e.g., Orf virus) Parapoxvirus (txid:10257)	129726	NC_013804.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	1579460	NC_025963.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	10258	NC_005336.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	129727	NC_005337.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	187984	NC_035188.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Vaccinia virus Orthopoxvirus vaccinia (txid:10245)	10245	NC_006998.1	NA	86.96 %	80.00 %	92.31 %	95.83 %	NA
Cowpox virus	10243	NC_003663.2	NA	91.30 %	80.00 %	92.31 %	95.83 %	86.67 %
Ectromelia (mousepox) virus	12643	NC_004105.1	NA	86.96 %	80.00 %	96.15 %	NA	NA
Camelpox virus	28873	NC_003391.1	NA	86.96	NA	92.31	95.83	86.67

				%		%	%	%
Buffalopox	28873	MG599038.1	NA	86.96 %	80.00 %	92.31 %	95.83 %	NA
Herpes simplex virus (HSV-1 and HSV-2)	10298	NC_001806.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	10310	NC_001798.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Varicella-zoster virus (Chickenpox)	10335	NC_001348.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Streptococcus mitis</i>	28037	CP012646.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	93061	NC_007795.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1282	CP035288.1	80.00 %	NA	NA	NA	NA	NA
		CP035289.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CP035290.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1314	LS483338.1	80.00 %	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1311	CP012480.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CP012742.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	208964	AE004091.2	NA	82.61 %	NA	NA	NA	NA
<i>Trichophyton rubrum</i>	5551	GG700682.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700681.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700680.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700679.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700678.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700677.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700676.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700675.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700674.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700673.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700672.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700671.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700670.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700669.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700668.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700667.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700666.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700665.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700664.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700663.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700662.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700661.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700660.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700659.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700658.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700657.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700656.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700655.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700654.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700653.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700652.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700651.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA

			GG700650.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			GG700649.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			GG700648.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			GG730037.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Corynebacterium jeikeium</i>		38289	CP063195.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Candida albicans</i>		237561	CP017623.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP017624.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP017625.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP017626.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP017627.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP017628.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP017629.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP017630.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Human Genomic DNA		9606	GRCh38.p14	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Lactobacillus species</i>	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	1600	CP044496.1	80.00 %	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1579	CP139575.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	83683	CP031835.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP031836.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus apis</i>	303541	CP029476.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus casei</i>	1423732	AP012544.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			AP012545.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			AP012546.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	47770	CP039266.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP039267.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1217420	CP018218.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	324831	CP000413.1	80.00 %	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus kullabergensis</i>	1218493	CP029477.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	267818	CP061341.1	80.00 %	NA	NA	NA	NA	NA
			CP061343.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP061342.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	33959	CP059055.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus jensenii</i>	109790	CP018809.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus isalae</i>	2993455	NZ_OX443569.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus iners</i>	147802	CP049230.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1587	CP151471.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA

	<i>Lactobacillus helsingborgensis</i>	1218494	CP029544.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP029545.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus xylocopicola</i>	2976676	NZ_AP026803.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus terrae</i>	2269374	CP024610.1	80.00 %					
	<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	508451	CP059278.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP059277.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP059276.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus paragasseri</i>	2107999	AP018549.1	80.00 %	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus panisapium</i>	2012495	CP048268.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Lactobacillus mulieris</i>	2508708	CP160088.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
<i>Escherichia coli</i>		386585	BA000007.3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		471	AB011548.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>				AB011549.2	NA	NA	NA	NA	NA
			NZ_CP020000.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Bacteroides fragilis</i>		272559	CR626927.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CR626928.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Enterococcus faecalis</i>		1351	NZ_AP026714.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Streptococcus Group C</i>	<i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i>	40041	CP065054.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP065055.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Streptococcus Group G</i>		1320	GQ184567.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>		1717	NZ_LN831026.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		485	AP023069.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			AP023070.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Chlamydia trachomatis</i>		272561	NC_000117.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		2104	NZ_LR214945.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			NZ_LR214946.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Mycoplasma genitalium</i>		2097	CP159789.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Human papillomavirus (HPV)		10566	NC_027779.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Trichomonas vaginalis</i>		412133	CM044617.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CM044618.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CM044619.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CM044620.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA

		CM044621.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CM044622.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Treponema pallidum</i>	243276	NC_021490.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Table 18. Percentage homology of G2R forward (FWD), G2R reverse (RV), G2R probe, F3L forward (FWD), F3L reverse (RV) and F3L probe (VIASURE *Monkeypox Virus* Real Time PCR Detection Kit) of the aligned sequences (>80%). NA = not applicable: homology percentage below 80%. * Results at $\geq 80\%$ homology.

Overall, as already seen in Table 15, *in-silico* cross-reactivity was observed for Variola, Cowpox and Camelpox viruses. As explained before, the non-detection of Cowpox virus was verified in a wet analysis conducted with the human-like specimen containing the Cowpox, OPV 88-Lunge (indicated in section “Cross-reactivity wet testing”), and in the case of Variola and Camelpox, low-risk cross-reactivity is expected, since the eradication declaration of Variola by the World Health Assembly in 1980, and the punctual cases of human infection of Camelpox virus, with no reported human-to-human transmission.

Regarding the results presented in Table 18, for those microorganisms that showed $\geq 80\%$ homology with one of the targets design included in the device (e.g., *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *L. acetotolerans*, *L. gasseri*, *L. kefirifaciens*, *L. terrae* and *L. paragasseri*), a microbial interference risk assessment was performed to evaluate the potential cross-reactivity of the assay’s primers and probes with non-target organisms. According to the established evaluation criteria, if only one or two oligonucleotides of a primer/probe set (F3L or G2R) show $\geq 80\%$ homology, cross-reactivity can be excluded since PCR amplification is not expected. Likewise, when the potential amplicon length exceeds 500 nucleotides, cross-reactivity risk can also be discarded. Taking these criteria into account, together with the analytical, biological, and epidemiological plausibility assessments, the overall risk of microbial interference was determined to be very low and acceptable.

In conclusion, the VIASURE Monkeypox virus target designs should not cause false positives in detecting this virus when other organisms are present.

Analytical specificity wet testing

Cross-reactivity wet testing

The cross-reactivity of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit was confirmed by testing certified reference strains and/or nucleic acid from reference strains associated to skin lesions and/or transmission by close contact to body fluids, negative to the target under study. Additionally, a microbial interference study was conducted using certified reference strains and/or nucleic acid from reference strains associated to skin lesions and/or transmission by close contact to body fluids, negative to the target under study, and in presence of the target under study (reference strain of Monkeypox virus). When possible and when the concentration data were available, the microorganisms were evaluated at medically relevant levels (10^6 CFU/mL for bacteria and 10^5 PFU/mL for viruses).

No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested, excepted for the targeted microorganism when present. Likewise, no microbial interference was observed, as no significant modification of the Ct obtained with respect to the control sample was observed.

Cross-reactivity testing					
Control sample (MPXV) *	-/+	Varicella-Zoster Virus strain rubrum	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ATCC 27853	-
<i>Candida albicans</i> strain NCYC 597	-	Varicella-Zoster Virus strain Ellen	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i> strain NCIMB 775	-	Varicella-Zoster Virus strain Ellen / MPXV *	-/+	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Escherichia coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	-	<i>Chlamydia trachomatis</i> [§]	-	Cowpox OPV 88-Lunge	-
Herpes simplex virus 1 (HSV-1) Strain MacIntyre	-	<i>Chlamydia trachomatis</i> [§] / MPXV *	-/+	Vaccinia Virus Elstree	-
Herpes simplex virus 1 (HSV-1) Strain MacIntyre / MPXV *	-/+	<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i> PCI 1200	-
Herpes simplex virus 2 (HSV-2) strain MS	-	Human papillomavirus 16	-	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Lp 39	-
Herpes simplex virus 2 (HSV-2) strain MS / MPXV *	-/+	Human papillomavirus 18	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> strain PI 1428	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain ATCC 25923	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> M30	-	<i>Streptococcus pyogenes</i> strain MGAS 8232	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> strain Z019	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> strain NCTC 8375 [B 5025]	-	Human Genomic DNA	-
Monkeypox Clade I (Congo Basin clade/Central African isolate)	-/+	Monkeypox Clade IIb (West African clade/2022 Outbreak isolate)	-/+		

Table 19. Reference microorganisms used in this study.

* This reagent was deposited by the Centers for Disease Control and Prevention and obtained through BEI Resources, NIAID, NIH: Monkeypox Virus, hMPXV/USA/MA001/2022 (Lineage B.1, Clade IIb), NR-58622.

[§] A panel comprising 12 clinical isolates representing serovars associated with trachoma and urogenital infections. *Chlamydia trachomatis*, Serovar A (ATCC VR-571B). *Chlamydia trachomatis*, Serovar B (ATCC VR573). *Chlamydia trachomatis*, Serovar Ba (ATCC VR-347). *Chlamydia trachomatis*, Serovar C (ATCC VR-1477). *Chlamydia trachomatis*, Serovar D (ATCC VR-885). *Chlamydia trachomatis*, Serovar E (ATCC VR-348B). *Chlamydia trachomatis*, Serovar F (ATCC VR-346). *Chlamydia trachomatis*, Serovar G (ATCC VR-878). *Chlamydia trachomatis*, Serovar H (ATCC VR-879). *Chlamydia trachomatis*, Serovar I (ATCC VR-880). *Chlamydia trachomatis*, Serovar J (ATCC VR-886). *Chlamydia trachomatis*, Serovar K (ATCC VR-887).

Interferences and inhibitors of PCR

A study of interfering substances was performed to test the possible interfering and cross-reactive effect of endogenous and exogenous substances on VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. A total of 19 potentially interfering substances were evaluated. The samples were extracted with MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 12gC instrument, and run on DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology). The rehydrated master mix without any interfering substance was used as a control for the test, to which the nucleic acid extracted from the simulated sample was added (Mixture control or Positive Matrix Control, PMC). In addition to this, the negative matrix without potentially interfering substances nor added microorganism/ reference material was tested as Negative Matrix Control (NMC).

Evaluation of the interference in qPCR assay alone

The following results were obtained when potentially interfering substance was added directly to the rehydrated master mix, which also contains the nucleic acid previously extracted from the simulated samples:

Substance Name	Concentration tested	Result
Acyclovir	6.60x10 ⁻² mg/mL	N.I
Diphenhydramine (Neosayomol cream/Benadryl cream)	0.625 mg/mL	N.I
EDTA whole blood	0.625%	N.I
Petrolatum containing lip/skin care	0.625 mg/mL	N.I
Casein	7 mg/mL	N.I
Cornstarch	2.5 mg/mL	N.I
Faeces	0.22 %	N.I
Female urine	1%	N.I
Benzocaine containing local anaesthetic	0.625 mg/mL	N.I
Human Serum Albumin	10 mg/mL	N.I
Hydrocortisone cream	0.625 mg/mL	N.I
Male urine	1 %	N.I
Mucin	2.5 mg/mL	N.I
Bacitracin	0.625 mg/mL	N.I
Seminal fluid	7 %	N.I
Lidocaine cream	0.65 mg/mL	N.I
Douche	0.625 mg/mL	N.I
Vaginal Lubricant Liquid – water based	2.5 mg/mL	N.I
Zinc Oxide ointment	0.625 mg/mL	N.I

Table 20. Potential interference substances. N.I: No reportable interference.

Evaluation of the interference in the whole process (extraction and the qPCR)

The following results were obtained when potentially interfering substances were added to the simulated sample that was going to be extracted, from which the obtained eluate was added to the qPCR assay:

Substance Name	Concentration tested	Result
Acyclovir	6.60x10 ⁻² mg/mL	N.I
Diphenhydramine (Neosayomol cream/Benadryl cream)	2.5 mg/mL	N.I
EDTA whole blood	5 %	N.I
Petrolatum containing lip/skin care	2.5 mg/mL	N.I
Casein	7 mg/mL	N.I
Cornstarch	2.5 mg/mL	N.I
Faeces	0.22 %	N.I
Female urine	1%	N.I
Benzocaine containing local anaesthetic	2.5 mg/mL	N.I
Human Serum Albumin	10 mg/mL	N.I
Hydrocortisone cream	2.5 mg/mL	N.I
Male urine	1 %	N.I
Mucin	2.5 mg/mL	N.I
Bacitracin	2.5 mg/mL	N.I
Seminal fluid	7 %	N.I
Lidocaine cream	2.6 mg/mL	N.I
Douche	2.5 mg/mL	N.I
Vaginal Lubricant Liquid – water based	2.5 mg/mL	N.I
Zinc Oxide ointment	2.5 mg/mL	N.I

Table 21. Potential interference substances. N.I: No reportable interference.

In conclusion, different potentially interfering substances, both endogenous and exogenous, were tested on VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. The results obtained lead to conclude that, at the concentrations tested, no interference of any the evaluated substances is observed at the concentrations indicated for each condition.

12.5.2. Analytical reactivity

Analytical reactivity can be defined as the percentage of target microbial strains or DNA/RNA samples that give the correct positive result. Analytical reactivity was studied *in silico* and wet analyses.

Analytical reactivity *in silico* analysis

The Analytical Reactivity was assessed by using sequences downloaded from NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), GISAID EpiPox¹³ database, and an in-house bioinformatic analysis software, in order to demonstrate that MPXV can be correctly detected by the device under study.

The following sequences of the target pathogen were obtained:

- 12,779 sequences of Monkeypox virus, submitted up to December 05th, 2024. These sequences include the following:
 - 620 sequences of Monkeypox virus clade Ia (formerly clade I).
 - 195 sequences of Monkeypox virus clade Ib.
 - 48 sequences of Monkeypox virus clade IIa.
 - 11,499 sequences of Monkeypox virus clade IIb.

The results obtained after the analysis of sequences are shown in the following table:

Target	% sequences experimentally detected without mismatches	N° aligned sequences
MPXV clade Ia	100	540
MPXV clade Ib	100	176
MPXV clade IIa	50	4
MPXV clade IIb	99.32	11,460

Table 22. Analytical Reactivity *in silico* assay.

In conclusion, the analytical reactivity analysis showed correct detection of the MPXV with the VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

¹³ Khare, S., et al (2021) GISAID's Role in Pandemic Response. China CDC Weekly, 3(49): 1049-1051. doi: 10.46234/ccdcw2021.255
PMCID: 8668406

Analytical reactivity wet testing

The analytical reactivity of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against the following certified reference strains and material, including from the EQAs programmes, with a positive result:

- NATtrol™ Monkeypox Virus External Run Control, isolate USA/MA001/2022* (ZeptoMetrix Ref: NATMPXV-ERC).

* This reagent was deposited by the Centers for Disease Control and Prevention and obtained through BEI Resources, NIAID, NIH: Monkeypox Virus, hMPXV/USA/MA001/2022 (Lineage B.1, Clade IIb), NR-58622.

- AMPLIRUN® MONKEYPOX VIRUS DNA CONTROL, West African clade (Vircell, Ref: MBC146-R).
- Monkeypox Clade I (Congo Basin clade/Central African isolate).
- Monkeypox Clade IIb (West African clade/2022 Outbreak isolate).

In conclusion, all the material used in the analytical reactivity study was correctly detected, meeting the established acceptance criteria.

12.6. Metrological traceability

This assay is not designed for measuring purposes.

13. Clinical performance characteristics

The clinical performance of VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit was tested using clinical samples (mainly lesion swabs) from patients with suspected MPXV infection. In order to determine the clinical diagnostic accuracy, different multicenter evaluations were conducted through collaboration with national and international entities. A summary of the sites, sample type and workflow are included in the following table.

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Hospital Universitario Príncipe de Asturias (HUPA), Madrid, Spain	Lesion swabs in UTM	MagCore HF16 automated extraction system (RBC bioscience) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	MPXV
2	North-West London Pathology (NWLP), UK	Lesion/vesicle swabs in UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) *	EZ1 instrument (QIAGEN) + 7500 Fast real time PCR instrument (Applied Biosystems™)	MPXV
3.A	South-West London Pathology (SWLP), UK	Throat and lesion swabs in UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) §	QIAGEN EZ1&2 Virus Mini Kit 2.0 (QIAGEN) / EZ1 instrument (QIAGEN) + Rotor-Gene® Q (QIAGEN)	MPXV
3.B		Throat swabs in UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) §		
3.C		Lesion swabs in UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) §		
4	Viapath Analytics laboratory at St Thomas' Hospital, London, UK	Lesion swabs in UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) #	QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit (QIAGEN) / QIAsymphony SP instrument (QIAGEN) + 7500 Fast real time PCR instrument (Applied Biosystems™)	MPXV

5	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS), Zaragoza, Spain	Ulcerative lesion (rash or growth) swabs in VTM (Non-inactivated) (biocomma®) ~	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) and MagCore Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Low PCR Inhibition) / MagCore® automated nucleic acid extractors (RBC Bioscience) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	MPXV
6	Certest Biotec S.L, Zaragoza, Spain	Ulcerative lesion swabs in UTM® Universal Transport Medium™ (Copan)	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	MPXV
7	ONELABT S.A, Santa Elena, Ecuador	Skin lesion/vesicle swabs in UTM® Universal Transport Medium™ (Copan)	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	MPXV

Table 23. Site, sample type, workflow, and target.

* Previously inactivated with MagNA Pure 96 External Lysis Buffer (Roche Life Science) at 1:1.

\$ Previously mixed with NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer (LB) (bioMérieux) for lysing at 1:1.

Previously lysed by heat treatment with Lysis Buffer (QIAGEN) (200 µL of sample + 430µL of buffer).

~ Previously inactivated with Lysis Buffer Universal LB (Seegene) at 1:1.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values and the likelihood ratios (LR) for VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	LR+	LR-
1	Reference laboratory method *	MPXV	3	6	0	0	1 (0.29-1)	1 (0.54-1)	1 (0.43-1)	1 (0.61-1)	12.25 (0.82-181.65)	0.135 (0.010-1.814)
2	CDC MPX specific assay Li <i>et al</i> 2010 ¹⁴ + Sanger sequencing (only positive samples)	MPXV	39	21	1	0	1 (0.91-1)	0.95 (0.77-0.99)	0.97 (0.86-0.99)	1 (0.83-1)	15.1 (3.2-71.17)	0.013 (0.001-0.21)
3.A	CDC MPX specific assay Li <i>et al</i> 2010 ¹⁴ + Sanger sequencing (only positive samples)	MPXV	20	34	0	0	1 (0.83-1)	1 (0.89-1)	1 (0.79-1)	1 (0.87-1)	68.3 (4.35-1,071)	0.024 (0.002-0.317)
3.B			1	3	0	0	1 (0.02-1)	1 (0.29-1)	1 (0.05-1)	1 (0.3-1)	6 (0.39-90.4)	0.28 (0.01-0.377)
3.C			19	31	0	0	1 (0.82-1)	1 (0.88-1)	1 (0.79-1)	1 (0.86-1)	62.4 (3.98-977)	0.025 (0.002-0.39)
4	CDC MPX specific assay Li <i>et al</i> 2010 ¹⁴ + Sanger sequencing (only positive samples)	MPXV \$	42	13	2	0	1 (0.91-1)	0.86 (0.59-0.98)	0.95 (0.84-0.99)	1 (0.75-1)	6.32 (2.02-19.76)	0.014 (0.001-0.21)
5 ~	RealStar Orthopoxvirus PCR kit 1.0 (Altona Diagnostics)	MPXV	69	96	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.98-1)	1 (0.93-1)	1 (0.95-1)	192.61 (12.133-3057.7)	0.007 (0.000-0.114)
6	RealStar Orthopoxvirus PCR kit 1.0 (Altona Diagnostics)	MPXV	38	348	1	0	1(0.9-1)	0.99(0.98-1)	0.97(0.86-0.99)	1(0.98-1)	230(46.6-1137)	0.013(0.001-0.2)
7	WHO MPX	MPXV	102	160	0	1	0.99	1	1	0.99	317.3	0.01 (0.003-

¹⁴ Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. Yu Li, Hui Zhao, Kimberly Wilkins, Christine Hughes, Inger K. Damon. Journal of Virological Methods. Volume 169, Issue 1, October 2010, Pages 223-227.

	molecular assay (Li et al 2010) ¹⁴					(0.94-1)	(0.97-1)	(0.96-1)	(0.96-1)	(19.9-5052)	0.071)
	Monkeypox Virus (MPXV) Fast Real Time PCR Kit (BioPerfectus)	102	161	0	0	1 (0.96-1)	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)	322.4 (20.28-5133)	0.005 (0-0.077)
	CDC MPX specific assay Li et al 2010 ¹⁴	102	161	0	0	1 (0.96-1)	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)	322.4 (20.28-5133)	0.005 (0-0.077)

Table 24. True positive (TP) and negative values (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity, specificity, Positive Predictive Values (PPV), Negative Predictive Values (NPV) and the likelihood ratios (LR) for VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

* Two orthopoxvirus-generic PCRs and another MPXV-specific PCR, based on three publications^{15,16,17} + Sanger sequencing (for confirmation of MPXV positive samples) + Allplex™ Genital Ulcer Assay (Seegene) (only with MPXV negative samples).

\$ Kappa statistic value of 0.9055.

~ The results were identical between the two workflows, verifying that the device test has excellent performance as an open format product.

Results show high agreement to detect MPXV using VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. In addition, the use of other types of samples in some clinical evaluations helped to observe that in cases where vesicle swab samples were unavailable, certain alternative sample types showed comparable positive results when the viral load was sufficient.

¹⁵ Loparev, V. N., Massung, R. F., Esposito, J. J., & Meyer, H. (2001). Detection and differentiation of old world orthopoxviruses: restriction fragment length polymorphism of the crmB gene region. *Journal of clinical microbiology*, 39(1), 94–100. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.94-100.2001>

¹⁶ Li, Y., Olson, V. A., Laue, T., Laker, M. T., & Damon, I. K. (2006). Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 36(3), 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.03.012>

¹⁷ Kulesh, D. A., Loveless, B. M., Norwood, D., Garrison, J., Whitehouse, C. A., Hartmann, C., Mucker, E., Miller, D., Wasieleski, L. P., Jr, Huggins, J., Huhn, G., Miser, L. L., Imig, C., Martinez, M., Larsen, T., Rossi, C. A., & Ludwig, G. V. (2004). Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 84(9), 1200–1208. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700143>

ANNEX 1

OPEN FORMAT AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MPX101L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MPX101H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MPX106L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MPX106H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MPX112L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MPX112H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MPX113L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MPX113H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX101
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX136
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX172

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 stabilised¹ format. The assay uses a human housekeeping gene (haemoglobin subunit beta gene, *HBB* gene) as an **Endogenous Internal Control (EIC)** to follow-up the integrity of the sample, to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
Monkeypox virus (MPXV)	FAM	<i>G2R</i> and <i>F3L</i> genes
Endogenous Internal Control (EIC)	HEX*	<i>HBB</i> gene

Table A1 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel; to check most common detection channels consult the website www.certtest.es.

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 stabilised PCR Reaction-Mix could be placed inside different wells and could be

¹ Please note that both “stabilised”, and “lyophilised” terms are used indistinguishable and as synonyms throughout the entire document.

marketed on multiple formats. Table A1.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible instruments. Table A1.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible instruments. 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	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Monkeypox virus</i> 8-well strips	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	White (Opaque)	1/6/12 x 8-well strip
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilised ¹ DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate 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-MPX101L, VS-MPX101H, VS-MPX106L, VS-MPX106H, VS-MPX112L and VS-MPX112H.

* For component in stabilised format, the concentration range means after rehydration.

Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Monkeypox virus</i> 96-well plate	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	White (Opaque)	1 plate
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilised ¹ DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	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-MPX113L and VS-MPX113H.

* For component in stabilised format, the concentration range means after rehydration.

Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Monkeypox virus</i> 4-well strips	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	Transparent	2/9/18 x 4-well strip
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilised ¹ DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	White	1 vial x 1 mL
4-cap strip	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	-	Transparent	2/9/18 x 4-cap strip

Table A1 5. Reagents and materials provided in VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MPX101, VS-MPX136 and VS-MPX172. 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).

* For component in stabilised format, the concentration range means after rehydration.

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Lyophilised 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 lyophilised *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 into aliquots to minimize freeze and thaw cycles. For instance, Positive Control may be divided into 4 aliquots of 25 μL each one, but end user should choose the number of aliquots to prepare considering the maximum freeze/thaw cycles verified. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-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.

Please note: In case the number of reactions required/needed is less than supplied on one strip or plate, before removing the protective seal, carefully cut out the required wells and store the rest inside the bag with the desiccant. Peel off protective aluminium seal from plates or strips you need for the assay.

- 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, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

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 6. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (MPXV) and HEX (Endogenous Internal Control (EIC)). Depending on the equipment used, select in the thermocycler only the proper channels where targets are detected (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 <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MPX196T

Table A2. 1.References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit contains in Reaction-Mix tube well all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format. The assay uses a human housekeeping gene (haemoglobin subunit beta gene, *HBB* gene) as an **Endogenous Internal Control (EIC)** to follow-up the integrity of the sample, to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
Monkeypox virus (MPXV)	FAM	<i>G2R</i> and <i>F3L</i> genes
Endogenous Internal Control (EIC)	HEX*	<i>HBB</i> gene

Table A2. 2.Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel; to check most common detection channels consult website www.certtest.es.

A2.2 Reagents provided

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

Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Monkeypox virus</i> Reaction-Mix tube	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	White (Opaque)	4 vials
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilised ¹ DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	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-MPX196T.

* For component in stabilised format, the concentration range means after rehydration.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilised 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 lyophilised *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 into aliquots to minimize freeze and thaw cycles. For instance, Positive Control may be divided into 4 aliquots of 25µL each one, but end user should choose the number of aliquots to prepare considering the maximum freeze/thaw cycles verified. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.

A2.3.2 Lyophilised 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 lyophilised 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.

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 4°C±2°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 tubes 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. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (MPXV) and HEX (Endogenous Internal Control (EIC)). Depending on the equipment used, select in the thermocycler only the proper channels where targets are detected (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 hisopos de lesiones de personas sospechosas de infección por el virus de la viruela del mono por su profesional de la salud (PS). Esta prueba está destinada a ser usada como ayuda en el diagnóstico de la infección por la viruela del mono en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído de muestras clínicas, amplificado mediante PCR a tiempo real, y detectado mediante el uso de oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con una molécula fluorescente específicas para el virus de la viruela del mono.

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 *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).

2. Introducción y explicación

El virus de la viruela del mono (MPXV) es un virus lineal de DNA de doble cadena que pertenece al género *orthopoxvirus* de la familia *Poxviridae*, conocido por ser el responsable de causar la enfermedad de la viruela del mono (mpox) (Chauhan et al., 2023; Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023; WHO, 2024). Esta enfermedad es una afección vírica zoonótica con síntomas muy similares a los causados por otros *orthopoxvirus* (como el virus variólico o el virus de la viruela vacuna), que incluye lesiones cutáneas eruptivas, sarpullidos, fiebre, fatiga y linfadenopatía (Chauhan et al., 2023; Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023). La viruela del mono se describe como autolimitada y menos grave que la viruela, pero puede complicarse dependiendo de la cepa vírica y del estado inmunitario del individuo; por ejemplo, algunos grupos de riesgo de la población son los niños, las mujeres embarazadas o las personas inmunodeprimidas (Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023; WHO, 2024). Hasta ahora se han descrito dos clados, el del África Occidental (actualmente conocido como clado II) y el de la cuenca del Congo (África Central, actualmente conocido como clado I) (Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023; WHO, 2024). Estos son muy diferentes en cuanto a sus características epidemiológicas, clínicas y localización geográfica (Qudus et al., 2023).

La transmisión del MPXV de persona a persona puede producirse directamente por contacto con lesiones cutáneas, fluidos corporales o secreciones respiratorias de individuos infectados, o indirectamente por contacto con objetos o ropa de cama infectados (Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023; WHO, 2024). A continuación, este virus entra en el cuerpo del individuo sano a través de las membranas mucosas o la piel rota, y posteriormente, se propaga a través de las células inmunitarias residentes en los tejidos y los

ganglios linfáticos de drenaje (Lu et al., 2023; Qudus et al., 2023), dando lugar a un periodo de incubación de 6-13 días normalmente, aunque puede oscilar entre 5-21 días (WHO, 2024).

Desde los primeros casos de mpox en humanos descritos en la década de 1970 en países africanos, las infecciones han aumentado de forma constante en todos estos países hasta su propagación a regiones no endémicas, incluidos EE.UU. y países europeos (Chauhan et al., 2023; Qudus et al., 2023). En 2022, se describieron por primera vez brotes en varios países, debido a la transmisión de persona a persona por contacto sexual (Chauhan et al., 2023). Según la OMS y como reproduce el ECDC, desde el inicio de la vigilancia del mpox en 2022 y hasta julio de 2024, se notificaron más de 100.000 casos confirmados debidos a los clados I y II, incluidas más de 200 muertes, en más de 120 países de todo el mundo (ECDC, 2024; WHO, 2024a, 2024c). El 14 de agosto de 2024, la OMS declaró de nuevo el mpox como Emergencia de Salud Pública de Preocupación Internacional (PHEIC) basándose en la detección de un nuevo subclado (clado Ib) en la República Democrática del Congo, que se está extendiendo rápidamente y está siendo detectado en los países vecinos que no han informado previamente de mpox, y tiene el potencial de extenderse fuera de África y áreas más lejanas (WHO, 2024c).

Las similitudes en los síntomas clínicos entre las enfermedades causadas por *ortopoxvirus* y otras infecciones víricas, como el virus varicela-zóster, hacen que el diagnóstico sea todo un reto (Chauhan et al., 2023). Se necesitan ensayos de PCR en tiempo real para controlar los brotes y reducir la transmisión de persona a persona (Chauhan et al., 2023).

NOTA: para facilitar la comprensión, utilizaremos las siguientes abreviaturas a lo largo de todo el documento:

- Mpox: Enfermedad de la viruela del mono (antigua nomenclatura).
- MPXV: Virus de la viruela del mono.

3. Procedimiento

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit es un test de PCR en tiempo real no automatizado diseñado para la detección cualitativa de DNA del virus de la viruela del mono (MPXV), incluyendo los Clados I y II, en hisopos de lesiones. Tras el aislamiento del DNA, la identificación del MPXV se realiza mediante la amplificación de una región conservada de los genes *G2R* y *F3L*, usando cebadores específicos y sondas marcadas con fluorescencia. Esta prueba puede realizarse utilizando varios flujos de trabajo validados (véase la sección 5), que permiten una mayor versatilidad y adaptabilidad de uso.

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 DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit contiene todos los componentes necesarios para el ensayo de PCR en tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en un formato estabilizado¹. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como **Control Interno Endógeno (CIE)** (el gen *HBB*, codificante para la subunidad beta de la hemoglobina) para controlar la integridad de la muestra, el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa. 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. Si se produce una incorrecta recogida, almacenamiento y/o procesamiento de las muestras, este control puede resultar negativo.

Además, este kit contiene dos controles adicionales: el Control Positivo (CP) y el Control Negativo (CN). El CP es un DNA sintético no infeccioso positivo para la diana en estudio, que se utiliza para la monitorización de la amplificación PCR en cada ejecución. Por otro lado, el CN se utiliza para detectar amplificaciones inespecíficas durante la etapa de amplificación. Por favor, consulte la sección 11. Control de calidad para más información al respecto.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit incluye los materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para “Open format” y “Rotor-gene format” con productos con Control Interno Endógeno (CIE) y en el Anexo 2 para formato de tubo con productos con Control Interno Endógeno (CIE).

5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario

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 (Anexo 2).
- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

¹ Tenga en cuenta que los términos “estabilizado” y “liofilizado” se emplean indistintamente, y como sinónimos, durante todo el documento.

- 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, 100-1000 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®). Solo para formato Rotor Gene (Anexo 1).
- Blanco de muestra (Ver sección 8.2 Extracción de DNA).

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit se ha testado con diferentes flujos de trabajo, aunque han sido nueve los seleccionados como los principales para llevar a cabo la evaluación y validación analítica y/o clínica del dispositivo. Los siguientes instrumentos son los que se han considerado como validados para el uso de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit:

Instrumentos	
1	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) ²
2	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology)
3	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
4	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™)
5	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) ²
6	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology)
7	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
8	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™)
9	MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit / MagCore® automated nucleic acid extractors (RBC Bioscience) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) ²

Tabla 1. Métodos de extracción-amplificación (flujo de trabajo) validados empleando VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

Las versiones de los software y/o firmware utilizados durante la validación del funcionamiento del kit VIASURE fueron los siguientes:

- Termocicladores:
 - CFX Maestro 2.3 software, versiones 5.0.021.0616 y 5.3.022.1030, en equipos Bio-Rad.

² Ambos equipos, CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y el CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) son equivalentes y tienen las mismas características operativas. El termociclador CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) tiene también características similares, por lo que puede considerarse como equivalente.

- Realtime_PCR software, v7.9, específicamente la versión 7.9.9.25 (última edición), en el termociclador DNA-Technology.
- Rotor-Gene Q Series Software 2.3.5 (Build 1), utilizado en el equipo Rotor-Gene® Q (QIAGEN).
- 7500 Software v2.0.6, que aplica al termociclador de Applied Biosystems™.
- Sistemas de extracción automática:
 - 1.0.3 firmware versión 1.2A, perteneciente al equipo magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.).
 - L0-0205-D008, incluido en los extractores de ácidos nucleicos automatizados MagCore® (RBC Bioscience).

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

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test VIASURE Real Time PCR Detection Kits. Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición establecidos:

- DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology): Canal FAM -500*, Canal HEX - 1000, Canal ROX - 1000 y Canal Cy5 - 1000.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa un elevado ruido de fondo, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente a 150.

Las muestras seleccionadas para la evaluación del dispositivo fueron hisopos de lesiones recogidos con hisopos de fibra sintética estériles con plástico, inmediatamente colocadas en un tubo de transporte estéril con medio de transporte universal (UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) (flujos de trabajo 1-8) o en Medio de Transporte Viral (-VTM- Virus Transport and Preservation Medium (Non-inactivated) (biocomma ®) (flujo de trabajo 9).

6. Condiciones de transporte, almacenamiento y uso

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- Evitar vibraciones durante el transporte para evitar la fuga de líquidos.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Se recomienda separar en alícuotas (por ejemplo, 4 alícuotas de 25 µL cada una) para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Para kits en formato tubo: Una vez el vial *Monkeypox virus* Reaction-Mix ha sido reconstituido, puede mantenerse a 25±5°C o 4±2°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda

almacenar a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Se ha validado la estabilidad de la mezcla de reacción en formato tubo tras 6 ciclos de congelación y descongelación. Una vez ha sido abierto o rehidratado el tubo, debe guardarse alejado de la luz.

- Para kits de formato abierto (tiras y placas): Para un uso adecuado del kit, se recomienda no rehidratar pocillos adicionales que no necesiten ser utilizados. Si no se utilizan todos los pocillos provistos en una tira de 8 pocillos o placa de 96 pocillos, la cantidad requerida de pocillos de reacción se puede cortar fácilmente de las tiras de 8 pocillos o placas de 96 pocillos. Si no se utilizan todos los pocillos, se recomienda que los pocillos no utilizados se almacenen en las bolsas de aluminio proporcionadas con el gel de sílice dentro para evitar el contacto con la luz hasta su uso. La bolsa abierta con pocillos no rehidratados a 2-40°C es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- Para tiras y placas: Una vez que los pocillos a emplear se hayan rehidratado, tanto la adición del ácido nucleico como la realización de la PCR a tiempo real deben realizarse inmediatamente.
- Una vez extraído el ácido nucleico de la muestra clínica, el eluido se puede almacenar hasta 24 horas a 4-25°C o seis meses a -20 °C antes de agregarlo al ensayo qPCR.

La siguiente tabla resume las condiciones de transporte, almacenamiento y uso tanto para el kit completo como para cada componente:

Componente	Condiciones de transporte	Condiciones de almacenamiento	Condiciones "en-uso"
Kit completo VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit.	2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	* Ver condiciones "en uso" de cada componente.
<i>Monkeypox virus</i> well-strip o well-plate (Ver Anexo 1).		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Pocillos no rehidratados en un sobre abierto con el gel de sílice: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente (18-31°C)*.
Tubo de <i>Monkeypox virus</i> Reaction-Mix (Ver Anexo 2).		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Tubo rehidratado: 25±5°C o 4±2°C hasta 4 horas. Para un periodo más largo, almacenar directamente a -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente (18-31°C)*.
Vial <i>Monkeypox virus</i> Positive Control		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Control Rehidratado: -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente (18-31°C)*.
Rehydration Buffer		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente (18-31°C)*.
Vial Negative Control		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente (18-31°C)*.
Vial Water RNase/DNase free		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente (18-31°C)*.

Tabla 2. Resumen de las condiciones de transporte, almacenamiento y uso para el producto VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit y cada uno de sus componentes.

* Temperatura ambiente = 18°C – 31°C. Este rango se establece tras realizar ensayos donde se varían las condiciones de temperatura ambiente (a 30°±2) y/o el tiempo de exposición de la mezcla de reacción a dichas temperaturas (uso inmediato vs. 15 min), antes y

después de ser rehidratada, ambos casos con el sello protector abierto. La amplificación PCR se realizó a la temperatura ambiente establecida por los fabricantes de los termocicladores, correspondiente a un rango de 18°C-30°C.

7. Precauciones para el usuario

- 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 *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- Las instrucciones de uso se deben leer cuidadosamente antes de utilizar VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. No llevar a cabo el ensayo PCR hasta haber entendido la información sobre procedimientos, precauciones de seguridad y limitaciones descritas en las instrucciones de uso.
- 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 reactivos 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 reactivos una vez abiertos.
- Una vez retirado el aluminio protector de las placas o las tiras o abiertos los tubos, el usuario final deberá utilizar las placas, las tiras o los tubos en el menor tiempo posible para proteger la mezcla de reacción de la luz solar.
- A tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior a la suministrada en una tira o placa, antes de retirar el sello protector, corte con cuidado los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los reactivos con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencias: VS-MPX113L, VS-MPX113H, VS-MPX136 y VS-MPX172). Antes de cerrar los sobres, eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- Para evitar el deterioro de la etiqueta, no usar el producto cerca de disolventes.
- 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 las referencias VS-MPX101, VS-MPX136 y VS-MPX172 (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 cruzada.

- 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.
- Una vez abierto el sobre del Control Positivo o de la mezcla de reacción en formato de tubo, rehidratar los viales inmediatamente, utilizarlos en la reacción de PCR o conservarlos correctamente. No se recomienda dejar el vial abierto sin resuspender, ya que esto puede ocasionar el deterioro del reactivo.
- Una vez retirado el sello protector de aluminio de la placa o las tiras, utilícelas inmediatamente para el ensayo qPCR (rehidrate los pocillos, agregue las muestras y coloque las tiras/placa en el termociclador). No se recomienda dejar las tiras o la placa abiertas sin resuspender. Asimismo, una vez rehidratados los pocillos requeridos, se debe añadir el ácido nucleico en cada pocillo y llevarse a cabo el ensayo qPCR inmediatamente.
- 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 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) n° 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad debido a que se clasifican como no peligrosos 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) n° 1272/2008 (CLP) o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración. Se puede solicitar a Certest Biotec una declaración en la que se afirme el no requerimiento de la ficha de datos de seguridad.

- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- Asegúrese de que la configuración y las condiciones de los ajustes en el termociclador se realizan siguiendo las instrucciones de la sección “Protocolo PCR” en los Anexos 1 y 2 (protocolo DNA/RNA, número de ciclos, temperaturas, etc.).
- El certificado de análisis no se incluye con este producto, sin embargo, se puede solicitar a Certest Biotec en caso de necesidad.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para el procedimiento del test de productos “Open format” y “Rotor-gene format” con Control Interno Endógeno y el Anexo 2 para productos formato Tubo con Control Interno Endógeno.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit ha sido testado utilizando muestras de hisopos de lesiones, incluyendo vesículas, pústulas o costras, recogidas con hisopos de fibra sintética estériles con plástico, inmediatamente colocadas en un tubo de transporte estéril con medio de transporte universal (UTM® Universal Transport Medium™ (Copan)) o en Medio de Transporte Viral (-VTM- Virus Transport and Preservation Medium (Non-inactivated) (biocomma ®), dependiendo de la muestra. Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

La equivalencia entre el uso de UTM de Copan y de VTM de biocomma para la recogida de muestras del virus de la viruela del mono radica principalmente en la funcionalidad de ambos como medios de transporte viral. Los dos están diseñados para estabilizar las muestras virales para pruebas diagnósticas, particularmente durante el transporte desde el lugar de recogida hasta el laboratorio. Los medios UTM/VTM consisten generalmente en una solución equilibrada de sales y de agentes antimicrobianos que mantienen la integridad viral, a la vez que previenen del crecimiento bacteriano y fúngico. El medio UTM de Copan ha sido ampliamente validado y utilizado para una serie de patógenos víricos, incluyendo el MPXV, ya que preserva la viabilidad de los virus para pruebas moleculares. De manera similar, el VTM de biocomma realiza una función comparable, asegurando la conservación del ácido nucleico viral, que es crucial para las pruebas de diagnóstico basadas en la PCR. Ambos medios están diseñados para cumplir con las guías de la WHO y la CDC para la recogida y transporte de muestras virales.

La recolección, el almacenamiento y el transporte de las muestras deben mantenerse según las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras clínicas se deben recoger lo antes posible, durante la fase aguda de la enfermedad o en cualquier momento durante el curso clínico, y antes de comenzar el tratamiento, si es posible. Las muestras deberían obtenerse evitando secreciones biológicas que no sean de interés, y recogerse posteriormente en contenedores limpios y estériles, con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra). Todas las muestras deben etiquetarse con el nombre y el número de identificación de la persona de la que proceden, el origen de la muestra, la fecha y la hora en la que fue tomada. Tras la recogida, las muestras deben guardarse en una bolsa de bioseguridad, transportarse y procesarse con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes enviados para pruebas moleculares deben conservarse en condiciones controladas para que los ácidos nucleicos no se degraden durante el almacenamiento. Se recomienda el uso de muestras frescas para el ensayo. Tanto para el transporte (si fuera necesario) como para el almacenaje de las muestras clínicas hasta su procesamiento, se debería considerar la temperatura a la que tienen que conservarse, y por cuánto tiempo (también siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patogénico). En el caso de las muestras de hisopos de lesiones, deberían mantenerse a 2-8°C hasta 7 días³, o congeladas a -20°C o menos, idealmente a -80°C, para su conservación si el tiempo hasta su procesamiento supera los 7 días³ (con un máximo de 2 ciclos de congelación/descongelación).

Las muestras clínicas deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas y/o con los manuales de políticas de laboratorio. Como ejemplo, consulte la guía *Guidelines for Collecting and Handling Specimens for Mpox Testing*. (<https://www.cdc.gov/mpox/hcp/diagnosis-testing/collecting-specimens.html>).

Nota: las condiciones de recolección, transporte y almacenamiento de muestras indicadas anteriormente se sugieren en base a las recomendaciones para muestras de hisopos de lesiones (recogidas en medios de transporte (UTM o VTM)) destinadas a ser utilizadas para la detección de ácido nucleico, que aparecen en la guía referenciada de la CDC. Sin embargo, recomendamos seguir las pautas del laboratorio y/o el manual de políticas del laboratorio de microbiología para el transporte y la conservación adecuados de las muestras^{3,4}.

Se llevó a cabo un estudio interno para evaluar la estabilidad de las muestras con VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit, empleando muestras artificiales (hisopos negativos de lesiones en UTM® Universal Transport Medium™ (Copan), contaminados con MPXV) a dos concentraciones diferentes (2xLoD y 5xLoD). Las muestras se examinaron a 24, 48 y 168 horas tras haber estado almacenadas a 4°C±2°C, y a 24 horas tras haber sido mantenidas a 25°C±2°C. Los resultados demostraron un buen

³ *Guidelines for Collecting and Handling Specimens for Mpox Testing*. (<https://www.cdc.gov/mpox/hcp/diagnosis-testing/collectingspecimens.html>)

⁴ *Surveillance, case investigation and contact tracing for Monkeypox: Interim guidance* ([who.int](https://www.who.int))

rendimiento de las muestras almacenadas en todas las condiciones probadas, lo que cumple con los criterios de aceptación inicialmente establecidos, así como con los criterios de almacenamiento de muestras recomendados por las guías de la CDC.

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.

Tener en cuenta: El control positivo y negativo no deben ser extraídos. Sin embargo, para monitorizar o controlar el proceso de extracción y descartar posibles contaminaciones, se puede extraer un blanco de muestra (no suministrado en el kit) siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la muestra clínica. El blanco de muestra debería consistir en la misma matriz (real o simulada) que las muestras clínicas, previamente caracterizado como negativo para todas las dianas.

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado con muestras de hisopos de lesiones en medio UTM® Universal Transport Medium™ (Copan), extraídos con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), y analizados con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology), Rotor-Gene® (QIAGEN) o 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™). Además de estos flujos de trabajo, VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit se validó con muestras de hisopos de lesiones en medio Virus Transport and Preservation Medium (Non-inactivated) (biocomma®), extraídas con MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit / MagCore® automated nucleic acid extractors (RBC Bioscience) y analizadas en CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

En caso de emplear un flujo de trabajo distinto a los arriba mencionados, la validación de este nuevo flujo de trabajo debe ser realizada por parte del usuario final, siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.

9. Interpretación de resultados

9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)

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. Compruebe la señal de Control Interno Endógeno (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. El valor umbral debe establecerse en cada ensayo. Por favor, si su equipo establece el umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Para cada canal, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). Una vez establecido el umbral, se pueden interpretar el resto de las muestras del mismo ensayo.

El valor umbral de los diferentes canales podría ser diferente debido a la naturaleza química de los diferentes fluoróforos. El valor de umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a las diferentes intensidades de la señal.

También se recomienda incluir un blanco, que consta de una muestra negativa confirmada (la misma matriz que las muestras analizadas) para las dianas detectadas con el fin de establecer la línea de base del ensayo.

El uso de controles positivo y negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para el MPXV en el pocillo de control positivo.

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

Controles	MPXV (FAM) ¹	Control Interno Endógeno (HEX) ²	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	>40 o sin señal	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles. Valores Ct sin señal = sin curva de amplificación.

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 señal en el pocillo de control positivo para el canal diana), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El control positivo incluye la diana del gen *housekeeping HBB*; por lo tanto, se observan señales de amplificación en todos los canales diana, 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, **seleccione solo los canales donde se detectan las dianas**. Después, use la siguiente tabla, lea y analice los resultados:

MPXV (FAM)	Control Interno Endógeno (CIE) (HEX)	Interpretación de muestras individuales de pacientes	
≤40	≤40 ¹	Válido	DNA de MPXV detectado
>40 o sin señal	≤40 ²	Válido	Diana no detectada ²
>40 o sin señal	>40 o sin señal ²	Inválido	Test Fallido – Repita el test ²

Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores sin señal = sin curva de amplificación.

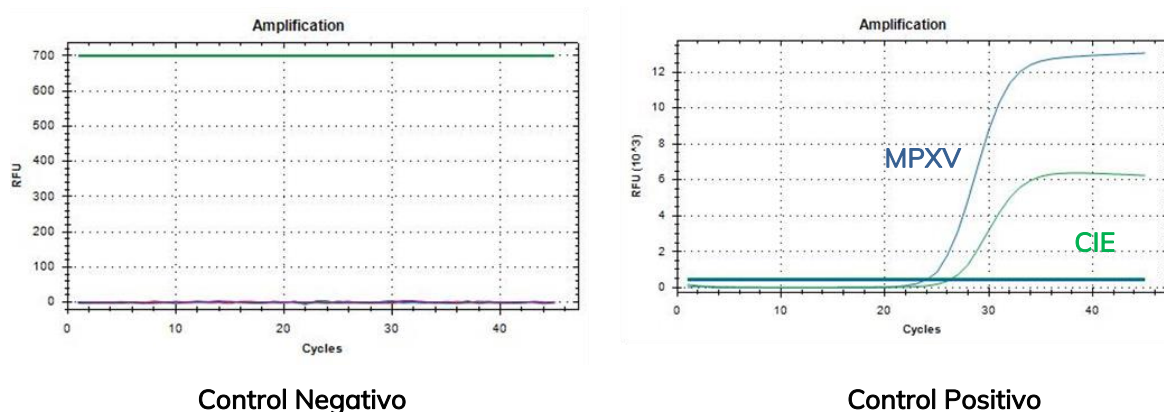
1 El Control Interno Endógeno (CIE) debe mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40). El control interno endógeno es un gen humano *housekeeping* que está presente en células humanas nucleadas. En caso de que la diana presente señal de amplificación y el Control Interno Endógeno no amplifique, la reacción se considerará 'Inválida' y se recomienda repetir la qPCR diluyendo el DNA 1:10 siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología. Los valores Ct entre 35-40 pueden indicar una subóptima recogida, almacenamiento y/o procesamiento de la muestra, por lo que se debe considerar la repetición de la prueba con muestras nuevamente recogidas y/o procesadas, en base al criterio clínico.

2 En el caso de que los genes diana del MPXV resulten negativos, el CIE debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤40. El valor de Ct podría ser muy variable debido a que el Control Interno Endógeno es un gen humano *housekeeping* que está presente en todas las células nucleadas humanas en la muestra original. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 40 del Control Interno Endógeno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la PCR a tiempo real 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, siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología. Las posibles causas de un valor Ct > 40 para el Control Interno Endógeno podrían deberse a una inadecuada recogida, almacenamiento y/o procesamiento de las muestras, a un fallo en uno o varios reactivos o debido a un error en el proceso de ciclado térmico de la PCR, así como a causa de la presencia de inhibidores.

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 PCR a tiempo real 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.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- El Control Interno Endógeno (CIE) debe mostrar una señal de amplificación ($Ct \leq 40$). Los valores Ct entre 35-40 pueden indicar una subóptima recogida, almacenamiento y/o procesado de la muestra, por lo que se debe considerar la repetición de la prueba con muestras nuevamente recogidas y/o procesadas, en base al criterio clínico.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de hisopos de lesiones.
- Es posible observar fenómenos “crosstalk” en canales vacíos del termociclador si no hay diana que detectar, por lo que es necesario seleccionar solo los canales donde éstas amplifiquen cuando se lleve a cabo la interpretación de resultados. Para cualquier consulta contacte con viasuresupport@certest.es.
- En el caso de que se utilicen los equipos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®, solo debe utilizarse un producto VIASURE por análisis, para evitar así posibles fenómenos “crosstalk” entre canales. Para cualquier consulta contacte con viasuresupport@certest.es.
- El uso operativo de este producto se ha validado únicamente en el rango de temperatura recomendado de 18-31°C, en consonancia con las especificaciones operacionales de los termocicladores de PCR en tiempo real comúnmente utilizados (consulte la Tabla 2). En caso de emplear unas condiciones de temperatura distintas, la validación de la nueva temperatura de trabajo debe ser realizada por parte del usuario final.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber 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. No es posible correlacionar los valores Ct obtenidos en la PCR a tiempo real con la concentración de la muestra, ya que éstos dependen del termociclador utilizado y de la propia ejecución.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Tenga en cuenta el rango de medición previsto del ensayo, ya que las muestras con concentraciones por encima o por debajo de este rango pueden dar resultados erróneos.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con el MPXV, ya sea a causa de *Monkeypox virus* Positive Control, por 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 clados nuevos o desconocidos del MPXV.
 - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de PCR a tiempo real u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, algunas terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma.
 - El efecto de sustancias interferentes solo se ha evaluado para aquellas indicadas en la sección 12.5.1 de estas Instrucciones de Uso (sección de Interferencias e inhibidores de PCR). Por favor, consulte dicha sección para comprobar las sustancias exógenas y endógenas más comunes que inducen una interferencia total o parcial de la reacción de PCR a tiempo real. Otras sustancias no indicadas en este apartado pueden dar lugar a resultados erróneos.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Se podría obtener una posible interferencia microbiana por parte de los ortopoxvirus Camelpox (virus responsable de la viruela del camello) y Variola (causante de la viruela), puesto que se observa una homología de $\geq 80\%$ con una de las dos dianas detectadas por el ensayo VIASURE. Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud en el contexto de la incidencia del virus, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico.
 - El análisis *in silico* mostró una homología de secuencia $\geq 80\%$ con ciertas especies de *Lactobacillus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, y *P. aeruginosa*. No obstante, en base a su evaluación analítica, biológica y epidemiológica, la probabilidad de amplificaciones inespecíficas en relación con una posible interferencia se considera como muy baja y aceptable. Consulte la sección 12.5.1 Especificidad analítica para más información.
 - 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 el MPXV, 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 el MPXV. 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 virus.
 - Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades relacionadas con los poxvirus son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por

el MPXV, 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 (incluso siendo el mismo modelo), sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.
- El Control Positivo y el Control Negativo no deben extraerse, pero se recomienda incluir un blanco de muestra durante el proceso de extracción y qPCR para descartar posibles contaminaciones. Resultados falsos positivos probables podrían quedar sin detectar si se omite el blanco de muestra.
- 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 MPXV en una muestra clínica.

11. Control de calidad

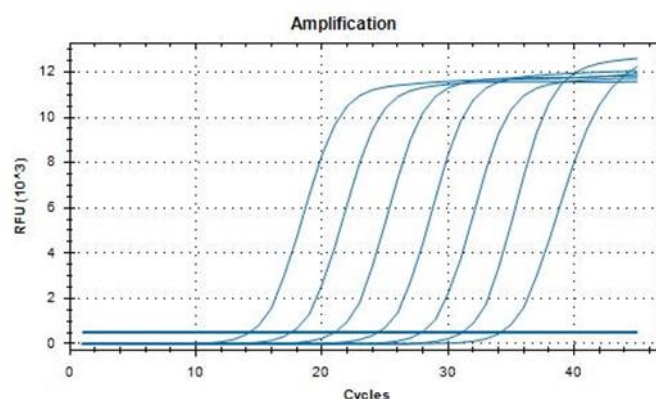
VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. El Control Positivo (CP) es un DNA sintético no infeccioso positivo para la diana en estudio, que se utiliza para la monitorización de la amplificación PCR en cada ejecución. El uso del CP tiene como finalidad única el control de la amplificación, y no tiene un objetivo de cuantificación. El CP podría no amplificar si la reacción PCR se inhibe por la presencia de un artefacto/inhibidor, por un fallo en uno o varios reactivos o en la etapa de la rehidratación de los pocillos, o debido a un error en el proceso de ciclado térmico de la PCR. Por tanto, si el CP no amplifica, la carrera queda invalidada. Por otro lado, el CN se utiliza para detectar amplificaciones inespecíficas durante la etapa de amplificación. Si se observan amplificaciones, la carrera queda invalidada. Finalmente, el Control Interno Endógeno (CIE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica y del proceso de extracción, y su presencia ratifica la calidad y la integridad del procesamiento de la muestra. Un EIC negativo indica que no hay presencia de DNA humano en la muestra debido a la recogida insuficiente de la misma, o por una recogida, almacenamiento y/o procesamiento de la muestra inadecuada.

12. Características analíticas del funcionamiento del test

12.1. Linealidad analítica

La linealidad del ensayo se determinó y confirmó analizando diluciones seriadas 1:10 de concentración conocida (en el rango entre 10^7 a 10^1 copias por reacción, es decir, entre 2×10^9 a 2×10^3 copias/mL) de DNA específico y sintético perteneciente al MPXV. A continuación, se incluye un ejemplo de la gráfica de amplificación resultante de un ensayo llevado a cabo en CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de MPXV (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM).



La linealidad del ensayo también se testó con los equipos DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology), Rotor-Gene® (QIAGEN) y 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™), analizando diluciones seriadas 1:10 de concentración conocida (en el rango entre 10^7 a 10^1 copias por reacción (2×10^9 a 2×10^3 copias/mL)) de DNA específico y sintético perteneciente a MPXV. Los resultados permitieron confirmar que la linealidad, la regresión lineal, la eficiencia y el nivel de detección observado para la diana detectada con VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit, y utilizando los cuatro termocicladores mencionados, cumplen con los criterios de aceptación.

12.2. Sensibilidad analítica. Límite de Detección (LoD)

La Sensibilidad Analítica o Límite de detección (LoD) de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit ha sido analizada utilizando hisopos de lesiones cutáneas en el medio UTM de Copan (para los flujos de trabajo 1-8), e hisopos de lesiones cutáneas en el medio VTM de biocomma (para el flujo de trabajo 9), contaminados con material de referencia para MPXV. Las muestras fueron extraídas y analizadas utilizando los siguientes flujos de trabajo:

	Extracción	Amplificación
1	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
2	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology)
3	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
4	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™)
5	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
6	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)	DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology)
7	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)	Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
8	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)	7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™)
9	MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit / MagCore® automated nucleic acid extractors (RBC Bioscience)	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Tabla 5. Método de extracción y amplificación (flujos de trabajo) validados utilizando VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit mostró tener un límite de detección experimental indicado en la siguiente tabla, con una tasa de positividad del $\geq 95\%$:

hisopos de lesiones cutáneas en el medio UTM Copan®								hisopos de lesiones cutáneas en el medio VTM biocomma®
FL 1	FL 2	FL 3	FL 4	FL 5	FL 6	FL 7	FL 8	FL 9
MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV
25 copias/mL	50 copias/mL	50 copias/mL	25 copias/mL	25 copias/mL	50 copias/mL	25 copias/mL	50 copias/mL	15 copias/mL

Tabla 6. Resultados LoD experimentales obtenidos con VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit, utilizando nueve flujos de trabajo e hisopos de lesiones cutáneas en UTM Copan® y en VTM biocomma® contaminados con material de referencia para MPXV. FL = Flujo de trabajo.

Tras emplear el Modelo Probit para el análisis de los resultados, VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit mostró tener el límite de detección indicado en la tabla siguiente, con una tasa de positividad del $\geq 95\%$:

hisopos de lesiones cutáneas en el medio UTM Copan®								hisopos de lesiones cutáneas en el medio VTM biocomma®
FL 1	FL 2	FL 3	FL 4	FL 5	FL 6	FL 7	FL 8	FL 9
MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV	MPXV
14 copias/mL	28 copias/mL	48 copias/mL	23 copias/mL	24 copias/mL	32 copias/mL	23 copias/mL	28 copias/mL	14 copias/mL

Tabla 7. Resultados LoD obtenidos con VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit tras el análisis Probit, utilizando nueve flujos de trabajo e hisopos de lesiones cutáneas en UTM Copan® y en VTM biocomma® contaminados con material de referencia para MPXV. FL = Flujo de trabajo.

Por tanto, los LoDs obtenidos por flujo de trabajo cumple con los criterios de aceptación inicialmente establecidos. No obstante, los LoDs experimentales fueron los que se consideraron como referencia para el resto de los análisis del rendimiento.

12.3. Rango de medición

El rango de medición del ensayo se determinó probando una serie de diluciones 1:10 que contenían una concentración conocida de DNA específico y sintético perteneciente a MPXV, y matizado con los experimentos de LoD. Los resultados permitieron confirmar la correcta detección de la diana en el rango de medición de 2×10^9 copias/mL hasta 25 copias/mL, cumpliendo así con los criterios de validación y aceptación inicialmente establecidos.

12.4. Exactitud

12.4.1 Veracidad (Sesgo)

La veracidad de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit fue evaluada frente al material de referencia listado a continuación. Las cepas de referencia fueron extraídas con MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y analizadas con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y

el DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology). En el caso de los DNA/RNA de referencia, fueron directamente analizados con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) o el DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology).

1. Fragmentos de DNA sintéticos:

- Nombre del fragmento de DNA sintético para MPXV (gen *GR2*): MPXXPC, canal FAM.
- Nombre del fragmento de DNA sintético para MPXV (gen *F3L*): MPXXPC, canal FAM.

2. ZeptoMetrix Corporation:

- NATtrol™ Monkeypox Virus External Run Control, isolate USA/MA001/2022* (ZeptoMetrix Ref: NATMPXV-ERC).

*Este reactivo fue depositado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades y obtenida a través de BEI Resources, NIAID, NIH: Monkeypox Virus, hMPXV/USA/MA001/2022 (Lineage B.1, Clade IIb), NR-58622.

3. Materiales control:

Referencia Externa	Nombre del patógeno	Variedad
MBC146-R	AMPLIRUN® MONKEYPOX VIRUS DNA CONTROL	Clado África occidental

Tabla 8. Material de referencia para Monkeypox virus procedente de Vircell S.L.

4. Programas EQA:

Procedencia	Nombre del patógeno	Muestras detectadas correctamente
QCMD 2022 y 2023 Poxviruses EQA Pilot Study	Monkeypox Clado I (clado Cuenca del Congo /aislado de África central)	POX22S2-01, POX22S2-06, POX22S2-07, POX22S2-08, POX22S2-10, POX23C1A-01, POX23C1A-04, POX23C1A-05, POX23C1A-07, POX23C1B-07 y POX23C1B-10
QCMD 2022 y 2023 Poxviruses EQA Pilot Study	Monkeypox Clado IIb (clado África occidental/aislado del brote del 2022)	POX22S2-03, POX22S2-04, POX23C1A-03, POX23C1A-09, POX23C1A-10, POX23C1B-02, POX23C1B-04, POX23C1B-05, POX23C1B-08 y POX23C1B-09

Tabla 9. Material de referencia procedente de paneles EQA.

12.4.2. Precisión

Para determinar la precisión de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit, se realizaron intra-ensayos (repetibilidad), inter-ensayos, ensayo inter-lote y ensayos inter-termociclador (reproducibilidad). El panel de muestras se analizó siguiendo el flujo de trabajo MagDEA Dx SV Kit, empleando el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) / DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology).

Intra-ensayo

El intra-ensayo se probó analizando réplicas de todas las muestras en la misma carrera utilizando VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit y el flujo de trabajo seleccionado. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en este ensayo.

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	MPXV	FAM	32,14	0,32	1,01
Positiva 2 (3xLoD)	MPXV	FAM	33,48	0,50	1,49
Muestra Negativa	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	HEX	26,56	0,27	1,00
Control Positivo	MPXV	FAM	24,30	0,09	0,38
Control Negativo	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	HEX	Neg	n.a.	n.a.

Tabla 10. Resultados del Intra-ensayo de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg= negativo, n.a.= no aplica.

Inter-ensayo.

El inter-ensayo se probó analizando las diferentes muestras en tres días diferentes por tres operadores diferentes con el VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit, ejecutado en DTPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology). En la siguiente tabla se muestra un resumen de los resultados.

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	MPXV	FAM	32,59	0,52	1,61
Positiva 2 (3xLoD)	MPXV	FAM	33,33	0,30	0,89
Muestra Negativa	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	HEX	26,66	0,71	2,67
Control Positivo	MPXV	FAM	24,40	0,20	0,81
Control Negativo	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	HEX	Neg	n.a.	n.a.

Tabla 11. Resultados de Inter-ensayo de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg= negativo, n.a.= no aplica.

Inter-lote

Los valores del ensayo inter-lote se determinaron analizando tres réplicas de diferentes muestras mediante el uso de tres lotes de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit en DTPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology). Los resultados se describen a continuación en la siguiente tabla.

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	MPXV	FAM	32,30	0,58	1,79
Positiva 2 (3xLoD)	MPXV	FAM	33,42	0,48	1,43
Muestra Negativa	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	HEX	26,86	0,45	1,67
Control Positivo	MPXV	FAM	24,46	0,40	1,65
Control Negativo	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	HEX	Neg	n.a.	n.a.

Tabla 12. Resultados del ensayo Inter-lote de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg= negativo, n.a.= no aplica.

Inter-termociclador

Los valores inter-termociclador fueron determinados con tres réplicas de la misma muestra utilizadas para intra-ensayo, inter-ensayo y ensayo inter-lote, utilizando VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. El DNA extraído de las muestras y controles positivo y negativo fueron analizados juntos en la misma carrera en CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™) y rn DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology). Los resultados obtenidos están descritos a continuación en la siguiente tabla.

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	MPXV	FAM	32,19	0,26	0,82
Positiva 2 (3xLoD)	MPXV	FAM	33,13	0,31	0,95
Muestra Negativa	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	HEX	26,51	0,69	2,61
Control Positivo	MPXV	FAM	24,41	0,26	1,05
Control Negativo	MPXV	FAM	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	HEX	Neg	n.a.	n.a.

Tabla 13. Resultados de ensayo Inter-termociclador de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg= negativo, n.a.= no aplica.

12.4.1. Exactitud

La exactitud de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit fue determinada considerando la combinación de las características de veracidad y precisión. Teniendo en cuenta los datos obtenidos en el experimento de precisión para la concentración 3xLoD como referencia para los valores Ct esperados (Veracidad), se emplearon tres lotes diferentes para probar las muestras a la misma concentración empleada en los experimentos de precisión. Se analizaron un total de 180 datos (Precisión): se realizaron tres carreras en tres termocicladores distintos, y en cada carrera se incluyeron un total de 60 réplicas (20 réplicas amplificadas por lote). Las muestras se extrajeron con el sistema MagDEA DX SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y se analizaron en los equipos CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™), y DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology).

Muestra	Diana	Canal Viasure	Valores de referencia de Exactitud (Veracidad)			Resultados de Exactitud (Precisión)		
			$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra 1 (3xLoD)	MPXV	FAM	32,40	0,50	1,55	32,85	0,35	1,05

Tabla 14. Resultados de Exactitud en comparación con los valores de referencia de exactitud (resultados de los ensayos de precisión → Veracidad) de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

Los resultados obtenidos muestran que el valor Ct medio conseguido de las 180 réplicas se encontraba entre el rango correspondiente al valor Ct obtenido en los experimentos de precisión $\pm$ la desviación estándar para la diana en estudio. Además, la desviación y el coeficiente de variación cumple con los requerimientos de aceptación.

12.5. Especificidad y reactividad analítica

La especificidad y reactividad analítica se evaluaron para el producto VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit *in silico* y experimentalmente, empleando diferentes materiales de partida como cepas de referencia certificadas, RNA/DNA de referencia certificados, así como material procedente de programas EQA.

12.5.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica es la habilidad del ensayo para detectar la diana prevista. Hay dos componentes a tener en cuenta para la especificidad analítica: la reactividad cruzada y la interferencia. La reactividad cruzada puede ocurrir cuando las secuencias/genes relacionados genéticamente están presentes en un espécimen de paciente, mientras que la interferencia puede ocurrir si la presencia de sustancias específicas potencialmente presentes en las matrices de las muestras afecta al rendimiento de la qPCR.

Reactividad cruzada: ensayo *in silico*

La reactividad cruzada se analizó empleando secuencias de otros microorganismos relacionados, pero diferentes de las dianas detectadas. Se evaluaron las secuencias descargadas de la base de datos del NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), mientras que el alineamiento de los cebadores y las sondas se llevó a cabo con BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y con un software de análisis bioinformático interno. Los resultados abajo mostrados solo se refieren a secuencias con un porcentaje de homología superior al 80%. Las secuencias alineadas con un porcentaje de alineamiento inferior al 80% de homología se consideraron improbables de ser detectadas. Los resultados más relevantes se muestran en la siguiente tabla:

Microorganismo	Referencia ID en NCBI o número RefSeq	% Homología
Borealpox virus ^a	MN240300	85%
Camelpox virus ^b	KC841322, KC841321, KC841320, KC841319, U87839, U87837, U87838, U87840	91.25%
Cowpox virus ^c	OM460002	97.26%
	LT896721, LR812035	95.89%
	KY549148, KY549144, HQ420900	94.52%
	KC813494, KC813493, FJ769342, FJ769341, FJ769340, FJ769339, FJ769337, AY623479, U90235, U90234, U90233, U90231, U90228, KY569019, KC813505, KC813496, FJ769336, U90227, U90226, KY549147, KY549146, KU861504, KC813510, KC813503	91.25%
	KC813509, KC813495, KC813492, KC813491, HQ328780, U90232, U90230, U90229, U90225, KC813506, KC813498, KC813497, FJ769338, KY549151	90%
Taterapox virus ^d	U86874	93.33%
Vaccinia virus ^e	MN369532, BK013340	90%
Variola major virus ^f	L22579	93.51%
Variola minor virus ^g	Y16780	93.51%
Variola virus ^h	LR800245, LR800244	94.81%
	BK010317, LT706529, LT706528, KY358055, NC_001611, OL468962, OL468961, DQ437592, DQ437591, DQ437590, DQ437589, DQ437588, DQ437587, DQ437586, DQ437585, DQ437584, DQ437583, DQ437582, DQ437581, DQ437580, DQ441448, DQ441447, DQ441446, DQ441445, DQ441444, DQ441443, DQ441442, DQ441441, DQ441440, DQ441439, DQ441438, DQ441437, DQ441436, DQ441435, DQ441434, DQ441433, DQ441432, DQ441431, DQ441430, DQ441429, DQ441428, DQ441427, DQ441426, DQ441425, DQ441424, DQ441423, DQ441421, DQ441420, DQ441419, DQ441418, DQ441417, DQ441416, X70841, U18341, U18339, X67117, X69198, U88152, U88151, U88150, U88148, U88147, U88146, U88145	93.51%
	LR800247, LR800246	92.21%

Tabla 15. Porcentaje de homología del set de primers y sonda para la detección de Monkeypox virus obtenido durante el análisis de reactividad cruzada, comparando las secuencias de referencia de los microorganismos similares a Monkeypox virus obtenidas de la base de datos NCBI.

^a En el caso del virus Borealpox (antiguamente Alaskapox), la secuencia detectada es la única secuencia del virus Borealpox disponible en la base de datos NCBI Nucleotide, y alinea con muy baja homología contra los primers y sondas para la detección de MPXV, siendo su detección muy poco probable. Además, solo se han confirmado unos pocos casos de borealpox, sin evidencia de infección entre humanos⁵. Sin embargo, la posibilidad de detección del patógeno se ha analizado experimentalmente mediante la evaluación de una serie de diluciones seriadas de concentración conocida (en el rango entre 10⁷ a 10¹ copias por reacción) de DNA específico y sintético perteneciente a los desajustes observados con las secuencias del virus Borealpox. Los resultados obtenidos mostraron que el ensayo VIASURE apenas detecta el virus Borealpox, descartando posibles problemas de reactividad cruzada.

⁵ Borealpox. (n.d.). Retrieved April 18, 2024, from <https://health.alaska.gov/dph/Epi/id/Pages/Borealpox.aspx>

^b Con relación a la viruela del camello, el virus responsable de esta enfermedad se restringe comúnmente a camellos ^{6,7}, afectando a humanos solo en casos puntuales, sin que se haya reportado transmisión de humano a humano.

^{c,d} Se ha informado de casos esporádicos de Cowpox⁸ y Taterapox⁹ en Europa, en su mayoría ligados al manejo de animales infectados, usualmente roedores y gatos. No hay evidencia conocida de transmisión entre humanos. Además, en el caso del virus Cowpox se ha verificado la no detección en ensayos experimentales realizados con muestras humanas simuladas que contenían el virus Cowpox, OPV 88-Lunge (indicado en la sección “Reactividad cruzada: ensayo experimental”).

^e El virus vaccinia es el patógeno utilizado para las vacunas de la viruela, siendo éstas las responsables de su erradicación. Por tanto, los casos humanos son extremadamente raros, sin notificaciones de infecciones entre humanos ^{10,11}. De nuevo, la no detección de este virus se llevó a cabo en un análisis experimental realizado con muestras humanas simuladas que contenían el virus Vaccinia, Elstree (indicado en la sección “Reactividad cruzada: ensayo experimental”).

^{f,g,h} Finalmente, la viruela (virus Variola) fue declarado como erradicado (eliminado) por la Asamblea Mundial de la Salud en 1980, y desde entonces no se han dado casos naturales de viruela ¹².

En las siguientes tablas se muestra información más detallada sobre las secuencias homólogas $\geq 80\%$ con las secuencias de los oligonucleótidos directo, reverso, y de la sonda incluidos en la mezcla de reacción VIASURE. La Tabla 16 incluye los organismos que alinean con los oligonucleótidos directo, reverso, y sonda para la detección de la diana *G2R* con un porcentaje de alineamiento mayor del 80%, pero con un porcentaje de homología menor del 80% con los oligonucleótidos directo, reverso y sonda para la detección de la diana *F3L* (datos no mostrados). La Tabla 17 muestra la lista de organismos que alinean con ambos sets de primers y sondas para la detección de las dianas *G2R* y *F3L* con un porcentaje de alineamiento mayor del 80%. Finalmente, la Tabla 18 incluye los microorganismos analizados y su porcentaje de alineamiento (homología) con el primer directo de *G2R*, con el primer reverso de *G2R*, con la sonda de *G2R*, con el primer directo de *F3L*, con el primer reverso de *F3L* y con la sonda de *F3L*, con un porcentaje superior al 80%. Tenga en cuenta que la amplificación PCR solo es esperable si los tres oligonucleótidos

⁶ Balamurugan V, Venkatesan G, Bhanuprakash V, Singh RK. Camelpox, an emerging orthopox viral disease. Indian J Virol. 2013 Dec;24(3):295-305. doi: 10.1007/s13337-013-0145-0. Epub 2013 Jul 16. PMID: 24426291; PMCID: PMC3832703.

⁷ Dahiya, S. S., Kumar, S., Mehta, S. C., Narnaware, S. D., Singh, R., & Tuteja, F. C. (2016). Camelpox: A brief review on its epidemiology, current status and challenges. Acta tropica, 158, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.014>

⁸ Krankowska, D. C., Woźniak, P. A., Cybula, A., Izdebska, J., Suchacz, M., Samelska, K., Wiercińska-Drapała, A., & Szaflik, J. P. (2021). Cowpox: How dangerous could it be for humans? Case report. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases, 104, 239–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.061>

⁹ Parker, S., Crump, R., Hartzler, H., & Buller, R. M. (2017). Evaluation of Taterapox Virus in Small Animals. Viruses, 9(8), 203. <https://doi.org/10.3390/v9080203>

¹⁰ Xiang, Y., & Lane, R. K. (2021). Vaccinia Virus (Poxviridae). Encyclopedia of Virology: Volume 1-5, Fourth Edition, 1–5, 854–859. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00047-3>

¹¹ Henderson D. A. (2011). The eradication of smallpox--an overview of the past, present, and future. Vaccine, 29 Suppl 4,D7–D9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.080>

¹² <https://www.cdc.gov/smallpox/index.html>

pertenecientes a un set (set F3L o set G2R) alcanzan un porcentaje de homología superior al 80%, y/o si el amplicón es menor de 500 nucleótidos. Si no es así, la reactividad cruzada puede descartarse.

Nombre FASTA	Homología con primer directo diana <i>G2R</i> (%)	Homología con sonda diana <i>G2R</i> (%)	Homología con primer reverso diana <i>G2R</i> (%)	Homología total (%)
AY623479.1 Cowpox virus strain CoPV/DEN/98 tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, complete cds	96,15	83,33	95,83	91,25
BK010317.1 TPA_asm: Variola virus isolate VD21, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
BK013340.1 TPA_asm: Vaccinia virus isolate VK02, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
DQ437580.1 Variola virus strain Afghanistan 1970 Variolator 4, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ437581.1 Variola virus strain Bangladesh 1975 v75-550 Banu, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ437582.1 Variola virus strain China Horn 1948, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ437583.1 Variola virus strain Congo 1970, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ437584.1 Variola virus strain Germany 1958 Heidelberg, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ437585.1 Variola virus strain India 1964 7124 Vellore, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ437586.1 Variola virus strain India 1964 7125 Vellore, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ437587.1 Variola virus strain Iran 1972 2602 Tabriz, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ437588.1 Variola virus strain Nepal 1973, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ437589.1 Variola virus strain Pakistan 1969 (Rafiq Lahore), complete sequence	88,46	86,67	100	91,25
DQ437590.1 Variola virus strain Somalia 1977, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ437591.1 Variola virus strain Sumatra 1970 V70-222, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ437592.1 Variola virus strain Syria 1972 V72-199, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441416.1 Variola virus strain Benin, Dahomey 1968 (v68-59), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441417.1 Variola virus strain Botswana 1972 (v72-143), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441418.1 Variola virus strain Botswana 1973 (v73-225), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441419.1 Variola virus strain Brazil 1966 (v66-39 Sao Paulo), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441420.1 Variola virus strain Bangladesh 1974 (nur islam), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441421.1 Variola virus strain Bangladesh 1974 (Shahzaman), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441423.1 Variola virus strain Congo 9 1970 (v74-227 Gispén), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441424.1 Variola virus strain Ethiopia 1972 (Eth16 R14-1X-72 Addis), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441425.1 Variola virus strain Ethiopia 1972 (Eth17 R14-1X-72 Addis), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441426.1 Variola virus strain Guinea 1969 (005), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441427.1 Variola virus strain India 1953 (Kali-Muthu-M50)	88,46	86,67	100	91,25

Madras), complete genome				
DQ441428.1 Variola virus strain India 1953 (New Delhi), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441429.1 Variola virus strain Japan 1946 (Yamada MS-2(A) Tokyo), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441430.1 Variola virus strain Japan 1951 (Harper, Masterseed), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441431.1 Variola virus strain Japan 1951 (Stillwell, Masterseed), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441432.1 Variola virus strain Korea 1947 (Lee, Masterseed), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441433.1 Variola virus strain Kuwait 1967 (K1629), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441434.1 Variola virus strain Niger 1969 (001, importation from Nigeria), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441435.1 Variola virus strain South Africa 1965 (102 Natal, lngwavuma), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441436.1 Variola virus strain South Africa 1965 (103 T'vaal, Nelspruit), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441437.1 Variola virus strain Sierra Leone 1969 (V68-258), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441438.1 Variola virus strain Somalia 1977 (V77-1252), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441439.1 Variola virus strain Somalia 1977 (V77-1605), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441440.1 Variola virus strain Sudan 1947 (Juba), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441441.1 Variola virus strain Sudan 1947 (Rumbec), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441442.1 Variola virus strain Sumatra 1970 V70-228, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441443.1 Variola virus strain Tanzania 1965 kembula, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441444.1 Variola virus strain United Kingdom 1946 Harvey, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441445.1 Variola virus strain United Kingdom 1946 Hinden (Middlesex), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441446.1 Variola virus strain United Kingdom 1947 Higgins (Staffordshire), complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441447.1 Variola virus strain United Kingdom 1952 Butler, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
DQ441448.1 Variola virus strain Yugoslavia 1972 V72-164, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
FJ769336.1 Cowpox virus isolate FIN/T2000 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	92,31	83,33	95,83	90
FJ769337.1 Cowpox virus isolate No-H2 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	96,15	83,33	95,83	91,25
FJ769338.1 Cowpox virus isolate No-F1 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	92,31	83,33	95,83	90
FJ769339.1 Cowpox virus isolate No-F2 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	96,15	83,33	95,83	91,25
FJ769340.1 Cowpox virus isolate No-H1 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	96,15	83,33	95,83	91,25
FJ769341.1 Cowpox virus isolate Swe-H1 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	96,15	83,33	95,83	91,25
FJ769342.1 Cowpox virus isolate Swe-H2 cytokine response modifier B (CrmB) gene, complete cds	96,15	83,33	95,83	91,25

HQ328780.1 Cowpox virus isolate IT-Llama09 tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, partial cds	92,31	83,33	95,83	90
KC813491.1 Cowpox virus strain BeaBer04/1, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KC813492.1 Cowpox virus strain HumLan08/1, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KC813493.1 Cowpox virus strain HumLit08/1, complete genome	96,15	83,33	95,83	91,25
KC813494.1 Cowpox virus strain HumLue09/1, complete genome	96,15	83,33	95,83	91,25
KC813495.1 Cowpox virus strain HumMag07/1, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KC813496.1 Cowpox virus strain HumPad07/1, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KC813497.1 Cowpox virus strain JagKre08/1, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KC813498.1 Cowpox virus strain JagKre08/2, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KC813503.1 Cowpox virus strain RatGer09/1, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KC813505.1 Cowpox virus strain RatKre08/2, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KC813506.1 Cowpox virus strain CatPot07/1, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KC813509.1 Cowpox virus strain HumBer07/1, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KC813510.1 Cowpox virus strain HumGra07/1, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KC841319.1 Camelpox virus isolate CMLV-DELHI tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, complete cds	92,31	86,67	95,83	91,25
KC841320.1 Camelpox virus isolate CMLV-BIKANER tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, complete cds	92,31	86,67	95,83	91,25
KC841321.1 Camelpox virus isolate CMLV-BARMER tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, complete cds	92,31	86,67	95,83	91,25
KC841322.1 Camelpox virus isolate CMLV-JAISALMER tumor necrosis factor receptor II-like protein (crmB) gene, complete cds	92,31	86,67	95,83	91,25
KU861504.1 Cowpox virus isolate Kostroma/2015 cytokine response modifier B gene, complete cds	92,31	86,67	95,83	91,25
KY358055.1 Variola virus strain VD21, 17th century, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
KY549146.1 Cowpox virus isolate CPXV_K779, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KY549147.1 Cowpox virus isolate CPXV_K780, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KY549151.1 Cowpox virus isolate Norwayfeline, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
KY569019.1 Cowpox virus strain CPXV CheNova_DK_2014, complete genome	96,15	83,33	95,83	91,25
L22579.1 Variola major virus (strain Bangladesh-1975) complete genome	88,46	86,67	100	91,25
LR800244.1 Variola virus genome assembly, complete genome: monopartite	92,31	86,67	100	92,5
LR800245.1 Variola virus genome assembly, complete genome: monopartite	92,31	86,67	100	92,5
LR800246.1 Variola virus genome assembly, complete genome: monopartite	88,46	86,67	95,83	90
LR800247.1 Variola virus genome assembly, complete genome: monopartite	88,46	86,67	95,83	90
LT706528.1 Variola virus isolate VARV_V563 genome assembly, chromosome: I	88,46	86,67	100	91,25
LT706529.1 Variola virus isolate VARV_V1588 genome assembly, chromosome: I	88,46	86,67	100	91,25
MN240300.1 Borealpox virus, complete genome	88,46	80	87,5	85
MN369532.1 Vaccinia virus isolate VK01, complete genome	92,31	83,33	95,83	90
NC_001611.1 Variola virus, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
OL468961.1 Variola virus strain GHA68, complete genome	88,46	86,67	100	91,25
OL468962.1 Variola virus strain Congo 1970 v70-60, complete genome	88,46	86,67	100	91,25

U18339.1 Variola virus Garcia-1966 right near-terminal region	88,46	86,67	100	91,25
U18341.1 Variola virus Somalia-1977 right near-terminal region	88,46	86,67	100	91,25
U86874.1 Taterapox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (crmB) gene, complete cds	92,31	86,67	91,67	90
U87837.1 Camelpox virus strain Somalia-1978 tumor necrosis factor receptor II homolog (crmB) gene, complete cds	92,31	86,67	95,83	91,25
U87838.1 Camelpox virus CP1 tumor necrosis factor receptor II homolog (crmB) gene, complete cds	92,31	86,67	95,83	91,25
U87839.1 Camelpox virus strain Saudi-M3, tumor necrosis factor receptor II homolog (crmB) gene, complete cds	92,31	86,67	95,83	91,25
U87840.1 Camelpox virus CP5 tumor necrosis factor receptor II homolog (crmB) gene, complete cds	92,31	86,67	95,83	91,25
U88145.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88,46	86,67	100	91,25
U88146.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88,46	86,67	100	91,25
U88147.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88,46	86,67	100	91,25
U88148.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88,46	86,67	100	91,25
U88150.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88,46	86,67	100	91,25
U88151.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88,46	86,67	100	91,25
U88152.1 Variola virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	88,46	86,67	100	91,25
U90225.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92,31	83,33	95,83	90
U90226.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92,31	83,33	95,83	90
U90227.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92,31	83,33	95,83	90
U90228.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	96,15	83,33	95,83	91,25
U90229.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92,31	83,33	95,83	90
U90230.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92,31	83,33	95,83	90
U90231.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	96,15	83,33	95,83	91,25
U90232.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	92,31	83,33	95,83	90
U90233.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	96,15	83,33	95,83	91,25
U90234.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	96,15	83,33	95,83	91,25
U90235.1 Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (CrmB) gene, complete cds	96,15	83,33	95,83	91,25
X67117.1 Variola virus (Xhol-F,O,H,P,Q genome fragment) genes	88,46	86,67	100	91,25
X69198.1 Variola virus DNA complete genome	88,46	86,67	100	91,25
X70841.1 Variola virus genes for ORF1R, ORF2R and ORF3R	88,46	86,67	100	91,25
Y16780.1 variola minor virus complete genome	88,46	86,67	100	91,25

Tabla 16. Porcentaje de homología directa, reversa y de la sonda para la detección de la diana *G2R* (VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit) de las secuencias alineadas (>80%).

Nombre FASTA	Homología con primer directo diana <i>G2R</i> (%)	Homología con sonda diana <i>G2R</i> (%)	Homología con primer reverso diana <i>G2R</i> (%)	Homología con primer directo diana <i>F3L</i> (%)	Homología con sonda diana <i>F3L</i> (%)	Homología con primer reverso diana <i>F3L</i> (%)
HQ420900.1 Cowpox virus strain UK2000_K2984, complete genome	92,31	86,67	95,83	100,00	92,00	91,30
KY549144.1 Cowpox virus isolate CPXV_Catpox5wv1, complete genome	92,31	86,67	95,83	100,00	92,00	91,30
KY549148.1 Cowpox virus isolate CPXV_1639, complete genome	92,31	86,67	95,83	100,00	92,00	91,30
LR812035.1 Cowpox virus isolate GerMygEK 938/17 genome assembly, complete genome: monopartite	96,15	83,33	95,83	96,00	96,00	95,65
LT896721.1 Cowpox virus isolate Ger 2010 MKY genome assembly, complete genome: monopartite	96,15	83,33	95,83	96,00	96,00	95,65
OM460002.1 Cowpox virus isolate No-H2, complete genome	96,15	83,33	95,83	100,00	96,00	95,65

Tabla 17. Porcentaje de homología directa, reversa y de la sonda para la detección de las dianas *G2R* y *F3L* (VIASURE Monkeypox virus Real Time PCR Detection Kit) de las secuencias alineadas (>80%).

Patógenos/microorganismos	ID Taxonomía	ID Acceso	FWD gen <i>F3L</i> *	RV gen <i>F3L</i> *	Sonda gen <i>F3L</i> *	FWD gen <i>G2R</i> *	RV gen <i>G2R</i> *	Sonda <i>G2R</i> *
Variola virus (smallpox)	10255	NC_001611.1	NA	86,96 %	80,00 %	88,46 %	100%	86,67 %
Molluscum contagiosum virus	10280	NC_001731.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Parapoxvirus (e.g., Orf virus) Parapoxvirus (txid:10257)	129726	NC_013804.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	1579460	NC_025963.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	10258	NC_005336.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	129727	NC_005337.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	187984	NC_035188.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Vaccinia virus Orthopoxvirus vaccinia (txid:10245)	10245	NC_006998.1	NA	86,96 %	80,00 %	92,31 %	95,83 %	NA
Cowpox virus	10243	NC_003663.2	NA	91,30 %	80,00 %	92,31 %	95,83 %	86,67 %
Ectromelia (mousepox) virus	12643	NC_004105.1	NA	86,96 %	80,00 %	96,15 %	NA	NA
Camelpox virus	28873	NC_003391.1	NA	86,96 %	NA	92,31 %	95,83 %	86,67 %
Buffalopox	28873	MG599038.1	NA	86,96 %	80,00 %	92,31 %	95,83 %	NA
Herpes simplex virus (HSV-1 and HSV-2)	10298	NC_001806.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	10310	NC_001798.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Varicella-zoster virus (Chickenpox)	10335	NC_001348.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Streptococcus mitis</i>	28037	CP012646.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	93061	NC_007795.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1282	CP035288.1	80,00 %	NA	NA	NA	NA	NA
		CP035289.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CP035290.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1314	LS483338.1	80,00 %	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1311	CP012480.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CP012742.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	208964	AE004091.2	NA	82,61 %	NA	NA	NA	NA
<i>Trichophyton rubrum</i>	5551	GG700682.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700681.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700680.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700679.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700678.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700677.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700676.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700675.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700674.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700673.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700672.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700671.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700670.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700669.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700668.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700667.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700666.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700665.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700664.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700663.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700662.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700661.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700660.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700659.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700658.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700657.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700656.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700655.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700654.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700653.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700652.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700651.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700650.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700649.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG700648.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GG730037.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	38289	CP063195.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Candida albicans</i>	237561	CP017623.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CP017624.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CP017625.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CP017626.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CP017627.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CP017628.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CP017629.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		CP017630.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Human Genomic DNA	9606	GRCh38.p14	NA	NA	NA	NA	NA	NA

<i>Lactobacillus species</i>	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	1600	CP044496.1	80,00 %	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1579	CP139575.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	83683	CP031835.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP031836.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus apis</i>	303541	CP029476.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus casei</i>	1423732	AP012544.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			AP012545.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			AP012546.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	47770	CP039266.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP039267.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1217420	CP018218.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	324831	CP000413.1	80,00 %	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus kullabergensis</i>	1218493	CP029477.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus kefirifaciens</i>	267818	CP061341.1	80,00 %	NA	NA	NA	NA	NA
			CP061343.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP061342.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	33959	CP059055.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus jensenii</i>	109790	CP018809.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus isalae</i>	2993455	NZ_OX443569.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus iners</i>	147802	CP049230.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1587	CP151471.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus helsingborgensis</i>	1218494	CP029544.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP029545.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus xylocopcola</i>	2976676	NZ_AP026803.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus terrae</i>	2269374	CP024610.1	80,00 %					
	<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	508451	CP059278.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP059277.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA

			CP059276.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus paragasseri</i>	2107999	AP018549.1	80,00 %	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus panisapium</i>	2012495	CP048268.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Lactobacillus mulieris</i>	2508708	CP160088.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Escherichia coli</i>		386585	BA000007.3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		471	AB011548.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			AB011549.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			NZ_CP020000.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Bacteroides fragilis</i>		272559	CR626927.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CR626928.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Enterococcus faecalis</i>		1351	NZ_AP026714.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Streptococcus Group C</i>	<i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i>	40041	CP065054.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CP065055.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Streptococcus Group G</i>		1320	GQ184567.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>		1717	NZ_LN831026.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		485	AP023069.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			AP023070.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Chlamydia trachomatis</i>		272561	NC_000117.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		2104	NZ_LR214945.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			NZ_LR214946.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Mycoplasma genitalium</i>		2097	CP159789.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Human papillomavirus (HPV)		10566	NC_027779.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Trichomonas vaginalis</i>		412133	CM044617.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CM044618.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CM044619.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CM044620.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CM044621.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			CM044622.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Treponema pallidum</i>		243276	NC_021490.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tabla 18. Porcentaje de homología del primer G2R directo (FWD), del primer G2R reverso (RV), de la sonda de G2R, del primer F3L directo (FWD), del primer F3L reverso (RV) y de la sonda F3L (VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit) de las secuencias alineadas (>80%). NA = no aplica: porcentaje de homología inferior al 80%. * Resultados al ≥ 80% de homología.

En conjunto, tal y como se mostró en la Tabla 15, se observó reactividad cruzada *in silico* para los virus Variola (responsable de la viruela), Cowpox, y Camelpox (viruela del camello). Tal y como se explicó anteriormente, se verificó la no detección del virus Cowpox en ensayos experimentales realizados con muestras humanas simuladas que contenían el virus Cowpox, OPV 88-Lunge (indicado en la sección “Reactividad cruzada: ensayo experimental”), mientras que en el caso de Variola y Camelpox, se espera una reactividad cruzada de bajo riesgo debido a la declaración de erradicación de Variola en 1980 por la

Asamblea Mundial de la Salud, y por los casos puntuales de infección humana por el virus Camelpox, del que no se ha reportado transmisión entre humanos.

En cuanto a los resultados presentados en la Tabla 18, para aquellos microorganismos que muestran una homología $\geq 80\%$ con uno de los diseños diana incluidos en el dispositivo (ej.: *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *L. acetotolerans*, *L. gasseri*, *L. kefiranofaciens*, *L. terrae* y *L. paragasseri*) se realizó una evaluación del riesgo de interferencias microbianas, con el objeto de evaluar la posible reactividad cruzada de los primers y sondas del ensayo con organismos no diana. De acuerdo con los criterios de evaluación establecidos, si solo uno o dos de los oligonucleótidos de un conjunto de primers/sonda (F3L o G2R) muestra homología $\geq 80\%$, se puede descartar la reactividad cruzada ya que la amplificación PCR no es esperable. Del mismo modo, el riesgo de reactividad cruzada también puede descartarse cuando la longitud del posible amplicón a obtener excede los 500 nucleótidos. Teniendo estos criterios en cuenta, junto con la valoración de la plausibilidad analítica, biológica y epidemiológica, el riesgo global de interferencia microbiana se estableció en muy bajo y aceptable.

En conclusión, los diseños para las dianas de VIASURE Monkeypox virus no deberían causar falsos positivos para la detección de este virus cuando otros organismos estén presentes.

Especificidad analítica: ensayo experimental

Reactividad cruzada: ensayo experimental

La reactividad cruzada de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit fue confirmada probando un panel de diferentes cepas de referencia certificadas y/o ácidos nucleicos de cepas de referencia asociados a lesiones cutáneas y/o transmisión por contacto estrecho con fluidos corporales, negativas para la diana a estudiar. Además, se realizó un estudio de interferencia microbiana utilizando cepas de referencia certificadas y/o ácidos nucleicos de cepas de referencia asociados a lesiones cutáneas y/o transmisión por contacto estrecho con fluidos corporales, negativas para la diana a estudiar, y en presencia de la diana bajo estudio (cepa de referencia del virus Monkeypox). Cuando fue posible, y cuando los datos de concentración estaban disponibles, los microorganismos se evaluaron a niveles médicamente relevantes (10^6 UFC/mL para bacterias y 10^5 PFC/mL para virus).

No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con el microorganismo diana cuando estaba presente. Del mismo modo, no se observó ninguna interferencia microbiana, ya que no se detectó ninguna modificación de Ct obtenido respecto a la muestra control.

Prueba de reactividad cruzada					
Muestra control (MPXV) *	-/+	Varicella-Zoster Virus cepa rubrum	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa ATCC 27853	-
<i>Candida albicans</i> cepa NCYC 597	-	Varicella-Zoster Virus cepa Ellen	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i> cepa NCIMB 775	-	Varicella-Zoster Virus cepa Ellen / MPXV *	-/+	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Escherichia coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	-	<i>Chlamydia trachomatis</i> [§]	-	Cowpox OPV 88-Lunge	-
Virus Herpes simple 1 (HSV-1) cepa MacIntyre	-	<i>Chlamydia trachomatis</i> [§] / MPXV *	-/+	Vaccinia Virus Elstree	-
Virus Herpes simple 1 (HSV-1) cepa MacIntyre / MPXV *	-/+	<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i> PCI 1200	-
Virus Herpes simple 2 (HSV-2) cepa MS	-	Papilomavirus humano 16	-	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa Lp 39	-
Virus Herpes simple 2 (HSV-2) cepa MS / MPXV *	-/+	Papilomavirus humano 18	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> cepa PI 1428	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> cepa ATCC 25923	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> M30	-	<i>Streptococcus pyogenes</i> cepa MGAS 8232	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> cepa Z019	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> cepa NCTC 8375 [B 5025]	-	DNA genómico humano	-
Monkeypox Clado I (clado cuenca del congo / aislado de África central)	-/+	Monkeypox Clado IIb (clado África occidental / aislado brote del 2022)	-/+		

Tabla 19. Microorganismos de referencia utilizados en el estudio.

*Este reactivo fue depositado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades y obtenida a través de BEI Resources, NIAID, NIH: Monkeypox Virus, hMPXV/USA/MA001/2022 (Lineage B.1, Clade IIb), NR-58622.

§ Panel que comprende 12 aislados clínicos que representan serovares asociados con tracoma e infecciones urogenitales. *Chlamydia trachomatis*, Serovar A (ATCC VR-571B). *Chlamydia trachomatis*, Serovar B (ATCC VR573). *Chlamydia trachomatis*, Serovar Ba (ATCC VR-347). *Chlamydia trachomatis*, Serovar C (ATCC VR-1477). *Chlamydia trachomatis*, Serovar D (ATCC VR-885). *Chlamydia trachomatis*, Serovar E (ATCC VR-348B). *Chlamydia trachomatis*, Serovar F (ATCC VR-346). *Chlamydia trachomatis*, Serovar G (ATCC VR-878). *Chlamydia trachomatis*, Serovar H (ATCC VR-879). *Chlamydia trachomatis*, Serovar I (ATCC VR-880). *Chlamydia trachomatis*, Serovar J (ATCC VR-886). *Chlamydia trachomatis*, Serovar K (ATCC VR-887).

Interferencias e inhibidores de PCR

Se realizó un estudio de sustancias interferentes para probar el posible efecto de interferencia y reacción cruzada de sustancias endógenas y exógenas en VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. Se han evaluado un total de 19 sustancias potencialmente interferentes. Las muestras se extrajeron empleando MagDEA Dx SV Kit junto con el equipo magLEAD® 12gc instrument (Precision System Science Co.), y se amplificaron con el termociclador DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology). Como control de la prueba se utilizó la mezcla de reacción rehidratada sin ninguna sustancia interferente añadida, añadiéndose posteriormente el ácido nucleico extraído de la muestra simulada (Control Matriz Positiva (PMC)). Además, se incluyó en el ensayo un control negativo, que consistió en una muestra de matriz negativa extraída y analizada en la qPCR sin sustancias interferentes potenciales ni microorganismos/material de referencia añadidos (Control Matriz Negativa (NMC)).

Ensayo de evaluación de interferencias qPCR en solitario

Los resultados obtenidos fueron los siguientes cuando la sustancia potencialmente interferente se añadió directamente la mezcla de reacción rehidratada, la cual también contiene el ácido nucleico previamente extraído de las muestras simuladas:

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
Aciclovir	6.60x10 ⁻² mg/mL	N.I
Difenhidramina (Neosayomol crema/Benadryl crema)	0.625 mg/mL	N.I
Sangre completa en EDTA	0.625%	N.I
Cuidado labial/de la piel con vaselina	0.625 mg/mL	N.I
Caseína	7 mg/mL	N.I
Almidón de maíz	2.5 mg/mL	N.I
Heces	0.22 %	N.I
Orina femenina	1%	N.I
Anestésico local con benzocaína	0.625 mg/mL	N.I
Albúmina de suero humano	10 mg/mL	N.I
Crema de hidrocortisona	0.625 mg/mL	N.I
Orina masculina	1 %	N.I
Mucina	2.5 mg/mL	N.I
Bacitracina	0.625 mg/mL	N.I
Fluido seminal	7 %	N.I
Crema de lidocaína	0.65 mg/mL	N.I
Ducha	0.625 mg/mL	N.I
Líquido lubricante vaginal – de base acuosa	2.5 mg/mL	N.I
Pomada de óxido de zinc	0.625 mg/mL	N.I

Tabla 20. Sustancias potencialmente interferentes. N.I: Interferencias no notificables.

Evaluación de la interferencia en todo el proceso (extracción y qPCR)

Los resultados obtenidos fueron los siguientes cuando la sustancia potencialmente interferente se añadió a la muestra simulada que iba a extraerse, de la que el eluido obtenido fue añadido al ensayo qPCR:

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
Aciclovir	6.60x10 ⁻² mg/mL	N.I
Difenhidramina (Neosayomol crema/Benadryl crema)	2.5 mg/mL	N.I
Sangre completa en EDTA	5 %	N.I
Cuidado labial/de la piel con vaselina	2.5 mg/mL	N.I
Caseína	7 mg/mL	N.I
Almidón de maíz	2.5 mg/mL	N.I
Heces	0.22 %	N.I
Orina femenina	1%	N.I
Anestésico local con benzocaína	2.5 mg/mL	N.I
Albúmina de suero humano	10 mg/mL	N.I
Crema de hidrocortisona	2.5 mg/mL	N.I
Orina masculina	1 %	N.I
Mucina	2.5 mg/mL	N.I
Bacitracina	2.5 mg/mL	N.I
Fluido seminal	7 %	N.I
Crema de lidocaína	2.6 mg/mL	N.I
Ducha	2.5 mg/mL	N.I
Líquido lubricante vaginal – de base acuosa	2.5 mg/mL	N.I
Pomada de óxido de zinc	2.5 mg/mL	N.I

Tabla 21. Sustancias potencialmente interferentes. N.I: Interferencias no notificables

En conclusión, diferentes sustancias potencialmente interferentes, tanto endógenas como exógenas, han sido evaluadas con VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. Los resultados obtenidos permiten concluir que, a las concentraciones evaluadas no se observan interferencias para ninguna de las sustancias evaluadas a las concentraciones indicadas para cada condición.

12.5.2. Reactividad analítica

La reactividad analítica puede definirse como el porcentaje de cepas microbianas diana o muestras de DNA/RNA que dan lugar a resultados positivos correctos. La reactividad analítica se estudió mediante análisis *in silico* y experimentales.

Reactividad analítica: evaluación *in silico*

La Reactividad Analítica se evaluó utilizando secuencias descargadas de la base de datos NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), GISAID EpiPox¹³, y un software de análisis bioinformático interno, para demostrar que MPXV puede detectarse correctamente por el dispositivo.

Se obtuvieron las siguientes secuencias del patógeno diana:

- 12,779 secuencias del virus Monkeypox, subidas hasta el 5 de Diciembre de 2024. Estas secuencias incluyen:
 - 620 secuencias del virus Monkeypox clado Ia (anteriormente clado I).
 - 195 secuencias del virus Monkeypox clado Ib.
 - 48 secuencias del virus Monkeypox clado IIa.
 - 11,499 secuencias del virus Monkeypox clado IIb.

Los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias se muestran en la siguiente tabla:

Diana	% secuencias experimentalmente detectadas sin desajustes	Nº secuencias alineadas
MPXV clado Ia	100	540
MPXV clado Ib	100	176
MPXV clado IIa	50	4
MPXV clado IIb	99,32	11.460

Tabla 22. Análisis *in silico* de la reactividad analítica.

En conclusión, el análisis de la reactividad analítica demostró una correcta detección del MPXV con VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

¹³ Khare, S., et al (2021) GISAID's Role in Pandemic Response. China CDC Weekly, 3(49): 1049-1051. doi: 10.46234/ccdcw2021.255 PMID: 8668406.

Reactividad analítica: evaluación experimental

La reactividad analítica de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a las siguientes cepas y material de referencia certificadas, incluidas de programas EQA, con un resultado positivo:

- NATtrol™ Monkeypox Virus External Run Control, isolate USA/MA001/2022* (ZeptoMetrix Ref: NATMPXV-ERC).

* Este reactivo fue depositado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades y obtenida a través de BEI Resources, NIAID, NIH: Monkeypox Virus, hMPXV/USA/MA001/2022 (Lineage B.1, Clade IIb), NR-58622.

- AMPLIRUN® MONKEYPOX VIRUS DNA CONTROL, clado África occidental (Viracell, Ref: MBC146-R).
- Monkeypox Clado I (clado cuenca del congo/aislado de África central).
- Monkeypox Clado IIb (clado de África occidental/aislado del brote de 2022).

En conclusión, todo el material utilizado en el estudio de reactividad analítica fue detectado correctamente, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos.

12.6. Trazabilidad metrológica

Este dispositivo no está diseñado para fines de medición.

13. Características del funcionamiento clínico

El funcionamiento clínico de VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit fue evaluado utilizando muestras clínicas (principalmente hisopos de lesiones) de pacientes con sospecha de infección por MPXV. Para determinar la exactitud del diagnóstico clínico, se han realizado diferentes evaluaciones multicéntricas en colaboración con entidades nacionales e internacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de los sitios, el tipo de muestra y el flujo de trabajo. Los resultados fueron los siguientes:

	Lugar	Tipo de muestra	Proceso	Diana
1	Hospital Universitario Príncipe de Asturias (HUPA), Madrid, España	Hisopos de lesiones en UTM	MagCore HF16 automated extraction system (RBC bioscience) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	MPXV
2	North-West London Pathology (NWLP), Reino Unido	Hisopos de lesiones/vesículas en UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) *	EZ1 instrument (QIAGEN) + 7500 Fast real time PCR instrument (Applied Biosystems™)	MPXV
3.A	South-West London Pathology (SWLP), Reino Unido	Hisopos de lesiones y faríngeos en UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) \$	QIAGEN EZ1&2 Virus Mini Kit 2.0 (QIAGEN) / EZ1 instrument (QIAGEN) + Rotor-Gene® Q (QIAGEN)	MPXV
3.B		Hisopos faríngeos en UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) \$		
3.C		Hisopos de lesiones en		

		UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) \$		
4	Viapath Analytics laboratory at St Thomas' Hospital, Londres, Reino Unido	Hisopos de lesiones en UTM® Universal Transport Medium™ (Copan) #	QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit (QIAGEN) / QIAAsymphony SP instrument (QIAGEN) + 7500 Fast real time PCR instrument (Applied Biosystems™)	MPXV
5	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS), Zaragoza, España	Hisopos de lesión ulcerosa (erupción o crecimiento) en VTM (Non-inactivated) (biocomma ®) ~	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) and MagCore Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Low PCR Inhibition) / MagCore® automated nucleic acid extractors (RBC Bioscience) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	MPXV
6	Certest Biotec S.L, Zaragoza, España	Hisopos de lesión ulcerosa en UTM® Universal Transport Medium™ (Copan)	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	MPXV
7	ONELABT S.A, Santa Elena, Ecuador	Hisopos de lesiones cutáneas/vesículas en UTM® Universal Transport Medium™ (Copan)	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	MPXV

Tabla 23. Lugar, tipo de muestras, proceso y diana.

* Inactivados previamente con MagNA Pure 96 External Lysis Buffer (Roche Life Science) a 1:1.

\$ Mezclados previamente con NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer (LB) (bioMérieux) para su lisis, a 1:1.

Lisados previamente por tratamiento térmico con Lysis Buffer (QIAGEN) (200 µL de muestra + 430µL de buffer).

~ Inactivados previamente con Lysis Buffer Universal LB (Seegene) a 1:1.

Los verdaderos valores positivos y negativos, los valores de falsos positivos y negativos, la sensibilidad, especificidad, PPV, NPV y cociente de verosimilitud (LR) para VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit fueron calculados en relación con cada ensayo de comparación como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	Ensayo Comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV	LR+	LR-
1	Método de referencia del laboratorio *	MPXV	3	6	0	0	1 (0,29-1)	1 (0,54-1)	1 (0,43-1)	1 (0,61-1)	12,25 (0,82-181,65)	0,135 (0,010-1,814)
2	Ensayo específico CDC MPX Li <i>et al</i> 2010 ¹⁴ + secuenciación Sanger (solo muestras positivas)	MPXV	39	21	1	0	1 (0,91-1)	0,95 (0,77-0,99)	0,97 (0,86-0,99)	1 (0,83-1)	15,1 (3,2-71,17)	0,013 (0,001-0,21)
3.A	Ensayo específico CDC MPX Li <i>et al</i> 2010 ¹⁴ + secuenciación Sanger (solo muestras positivas)	MPXV	20	34	0	0	1 (0,83-1)	1 (0,89-1)	1 (0,79-1)	1 (0,87-1)	68,3 (4,35-1,071)	0,024 (0,002-0,317)
3.B			1	3	0	0	1 (0,02-1)	1 (0,29-1)	1 (0,05-1)	1 (0,3-1)	6 (0,39-90,4)	0,28 (0,01-0,377)
3.C			19	31	0	0	1 (0,82-1)	1 (0,88-1)	1 (0,79-1)	1 (0,86-1)	62,4 (3,98-977)	0,025 (0,002-0,39)
4	Ensayo	MPXV	42	13	2	0	1 (0,91-1)	0,86 (0,59-0,98)	0,95	1 (0,75-1)	6,32 (2,02-	0,014

¹⁴ Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. Yu Li, Hui Zhao, Kimberly Wilkins, Christine Hughes, Inger K. Damon. Journal of Virological Methods. Volume 169, Issue 1, October 2010, Pages 223-227.

	específico CDC MPX Li <i>et al</i> 2010 ¹⁴ + secuenciación Sanger (solo muestras positivas)	\$							(0,84- 0,99)		19,76)	(0,001-0,21)
5 ~	RealStar Orthopoxvirus PCR kit 1.0 (Altona Diagnostics)	MPXV	69	96	0	0	1 (0,97-1)	1 (0,98-1)	1 (0,93-1)	1 (0,95-1)	192,61 (12,133- 3057,7)	0,007 (0,000- 0,114)
6	RealStar Orthopoxvirus PCR kit 1.0 (Altona Diagnostics)	MPXV	38	348	1	0	1(0,9-1)	0,99(0,98-1)	0,97(0,86- 0,99)	1(0,98-1)	230(46,6- 1137)	0,013(0,001- 0,2)
7	Ensayo molecular WHO MPX (Li et al 2010) ¹⁴	MPXV	102	160	0	1	0,99 (0,94-1)	1 (0,97-1)	1 (0,96-1)	0,99 (0,96-1)	317.3 (19.9-5052)	0.01 (0.003- 0.071)
	Monkeypox Virus (MPXV) Fast Real Time PCR Kit (BioPerfectus)		102	161	0	0	1 (0,96-1)	1 (0,97-1)	1 (0,97-1)	1 (0,97-1)	322.4 (20.28- 5133)	0.005 (0- 0.077)
	Ensayo específico CDC MPX Li <i>et al</i> 2010 ¹⁴		102	161	0	0	1 (0,96-1)	1 (0,97-1)	1 (0,97-1)	1 (0,97-1)	322.4 (20.28- 5133)	0.005 (0- 0.077)

Tabla 24. Valores de verdadero positivo (TP) y negativo (TN), valores de falso positivo (FP) y falso negativo (FN), sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (PPV), valores predictivos negativos (NPV) y cociente de verosimilitud (LR) para VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit.

* Dos PCRs genéricas de ortopoxvirus y otra PCR específica de MPXV, basadas en tres publicaciones^{15,16,17} + secuenciación Sanger (para la confirmación de muestras positivas para MPXV) + Allplex™ Genital Ulcer Assay (Seegene) (solo con muestras negativas para MPXV).

\$ Valor estadístico Kappa de 0.9055.

~ Los resultados fueron idénticos entre los dos flujos, verificando que el dispositivo muestra un rendimiento excelente como producto "open-format".

Los resultados muestran un alto nivel de concordancia para la detección de MPXV utilizando VIASURE *Monkeypox virus* Real Time PCR Detection Kit. Además, el uso de otros tipos de muestras en algunas evaluaciones clínicas ayudó a observar que, en los casos en los que no se disponía de muestras de hisopos vesicales, ciertos tipos de muestras alternativas mostraban resultados positivos comparables cuando la carga vírica era suficiente.

¹⁵ Loparev, V. N., Massung, R. F., Esposito, J. J., & Meyer, H. (2001). Detection and differentiation of old world orthopoxviruses: restriction fragment length polymorphism of the crmB gene region. *Journal of clinical microbiology*, 39(1), 94–100. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.94-100.2001>

¹⁶ Li, Y., Olson, V. A., Laue, T., Laker, M. T., & Damon, I. K. (2006). Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 36(3), 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.03.012>

¹⁷ Kulesh, D. A., Loveless, B. M., Norwood, D., Garrison, J., Whitehouse, C. A., Hartmann, C., Mucker, E., Miller, D., Wasieleski, L. P., Jr, Huggins, J., Huhn, G., Miser, L. L., Imig, C., Martinez, M., Larsen, T., Rossi, C. A., & Ludwig, G. V. (2004). Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 84(9), 1200–1208. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700143>

ANEXO 1

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-MPX101L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-MPX101H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MPX106L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MPX106H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MPX112L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MPX112H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-MPX113L
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-MPX113H
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX101
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX136
VIASURE <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MPX172

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 y polimerasa) en formato estabilizado¹. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como **Control Interno Endógeno (CIE)** (el gen *HBB*, codificante para la subunidad beta de la hemoglobina) para controlar la integridad de la muestra, el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Virus de la viruela del mono (MPXV)	FAM	Genes <i>G2R</i> y <i>F3L</i>
Control Interno Endógeno (CIE)	HEX*	Gen <i>HBB</i>

Tabla A1. 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.

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 a

¹ Tenga en cuenta que los términos "estabilizado" y "lío-filizado" se emplean indistintamente, y como sinónimos, durante todo el documento.

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 instrumentos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos 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	Rango de concentración	Color	Cantidad
<i>Monkeypox virus</i> 8-well strips	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1/6/12 tiras de 8 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa 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-MPX101L, VS-MPX101H, VS-MPX106L, VS-MPX106H, VS-MPX112L y VS-MPX112H.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

Reactivo/Material	Descripción	Rango de concentración	Color	Cantidad
<i>Monkeypox virus</i> 96-well plate	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1 placa
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa 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-MPX113L y VS-MPX113H.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

Reactivo/Material	Descripción	Rango de concentración	Color	Cantidad
<i>Monkeypox virus</i> 4-well strips	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Transparente	2/9/18 tiras de 4 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strip	Tapones ópticos para sellar la placa 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-MPX101, VS-MPX136 y VS-MPX172. 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).

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

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. Por ejemplo, el Control Positivo se puede dividir en 4 alícuotas de 25 μL cada una, pero es el usuario final el que debería elegir el número de alícuotas a preparar considerando en máximo número de ciclos de congelación/descongelación verificados. Se ha validado la estabilidad del Control Positivo tras 6 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.

Tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior al suministrado en una tira o placa, antes de retirar el sello protector, recorte cuidadosamente los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante. Retire el sello protector de aluminio de las placas o tiras que necesite para el ensayo.

- 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, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

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 (MPXV), y HEX (Control Interno Endógeno (CIE)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (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 <i>Monkeypox virus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-MPX196T

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 específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como **Control Interno Endógeno (CIE)** (el gen *HBB*, codificante para la subunidad beta de la hemoglobina) para controlar la integridad de la muestra, el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Virus de la viruela del mono (MPXV)	FAM	Genes <i>G2R</i> y <i>F3L</i>
Control Interno Endógeno (CIE)	HEX*	Gen <i>HBB</i>

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.certtest.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.

Reactivo/Material	Descripción	Rango de concentración	Color	Cantidad
<i>Monkeypox virus</i> Reaction-Mix tube	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	4 viales
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Monkeypox virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	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-MPX196T.

*Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

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. Por ejemplo, el Control Positivo se puede dividir en 4 alícuotas de 25 µL cada una, pero es el usuario final el que debería elegir el número de alícuotas a preparar considerando en máximo número de ciclos de congelación/descongelación verificados. Se ha validado la estabilidad del Control Positivo tras 6 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 abrir y manipular *Monkeypox virus* Reaction-Mix tube en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (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.

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 $25\pm5^{\circ}\text{C}$ o $4\pm2^{\circ}\text{C}$ 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. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (MPXV) y HEX (Control Interno Endógeno (CIE)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

Bibliography/Bibliografía

- Bawage, S. S., Tiwari, P. M., Pillai, S., Dennis, V., & Singh, S. R. (2013). Recent advances in diagnosis, prevention, and treatment of human respiratory syncytial virus. In *Advances in Virology* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/595768>
- Chauhan, R. P., Fogel, R., & Limson, J. (2023). Overview of Diagnostic Methods, Disease Prevalence and Transmission of Mpox (Formerly Monkeypox) in Humans and Animal Reservoirs. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051186>
- French, C. E., McKenzie, B. C., Coope, C., Rajanaidu, S., Paranthaman, K., Pebody, R., Nguyen-Van-Tam, J. S., Higgins, J. P. T., & Beck, C. R. (2016). Risk of nosocomial respiratory syncytial virus infection and effectiveness of control measures to prevent transmission events: a systematic review. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 10(4), 268–290. <https://doi.org/10.1111/irv.12379>
- Kuo, R. L., Yang, S. L., Liu, Y. C., Chen, L. T., Mok, C. K., Kuo, S. M., Shih, S. R., & Tsao, K. C. (2014). Influenza A/B virus detection and influenza A virus subtyping with emphasis on the novel H7N9 virus by using multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 208, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.020>
- Lu, J., Xing, H., Wang, C., Tang, M., Wu, C., Ye, F., Yin, L., Yang, Y., Tan, W., & Shen, L. (2023). Mpox (formerly monkeypox): pathogenesis, prevention, and treatment. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 8, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01675-2>
- Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2015). Transmission of influenza A viruses. *Virology*, 479–480, 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.009>
- Paul Glezen, W., Schmier, J. K., Kuehn, C. M., Ryan, K. J., & Oxford, J. (2013). The Burden of Influenza B: A Structured Literature Review. *American Journal of Public Health*, 103(3), e43–e51. <http://www.ajph.org>
- Qudus, M. S., Cui, X., Tian, M., Afaq, U., Sajid, M., Qureshi, S., Liu, S., Ma, J., Wang, G., Faraz, M., Sadia, H., Wu, K., & Zhu, C. (2023). The prospective outcome of the monkeypox outbreak in 2022 and characterization of monkeypox disease immunobiology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1196699>
- WHO. (2024). *Monkeypox virus*. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON385>

Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

	<i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		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.

Change Control / Control de Cambios		
Version No. / Versión nº	Changes / Cambios	Date / Fecha
00	Original Version / Versión Original	25/05/2022
01	Performance characteristics update. Typo correction / Actualización de las características del test. Corrección de texto	15/06/2022
02	Updating of validated sample type, extraction kits and PCR equipments, clinical sensitivity and specificity, analytical sensitivity, and correction of typo mistakes in cross-reactivity table and reagents-provided tables in sections A1.2 and A2.2 / Actualización del tipo de muestra validada, kits de extracción y equipos PCR, la sensibilidad y especificidad clínica, sensibilidad analítica, y corrección de errores en la tabla de reactividad cruzada y en las tablas de reactivos incluidos en el kit de las secciones A1.2 y A2.2	25/11/2022
03	Sections 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13 and Annexes were updated / Se han actualizado las secciones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13 y los Anexos.	30/09/2024
04	Modification of the Ct cut-off value of EIC to 40 in the results interpretation. Analytical sensitivity (LoD), <i>in silico</i> analytical reactivity results and data from clinical evaluation 7 has been updated. / Modificación del valor de corte Ct del CIE a 40 en la interpretación de resultados. Actualización de la sensibilidad analítica (LoD), reactividad analítica <i>in silico</i> y datos de la evaluación clínica 7.	18/12/2024
05	Possible reasons behind a potential negative result of the Endogenous Internal Control were explained in Sections 3 and 9. Interpretation of EIC results were updated in Section 9. Further information about sequences homology ≥80% was included in Section 12.5.1 Analytical Specificity (<i>in silico</i> assays) / En las secciones 3 y 9 se explican las posibles razones causantes de un potencial resultado negativo del Control Interno Endógeno. Se ha actualizado la interpretación de resultados del CIE en la sección 9. En la sección 12.5.1 Especificidad analítica (ensayos <i>in silico</i>) se incluyó más información sobre la homología de secuencias ≥80%.	02/05/2025
06	Intended user was included in the intended use. Indication of the assay as “non-automatized”, the clades detected, the intended use setting and a more developed	29/05/2025

	explanation of the PC and NC characteristics were added in section 3. Indication of number of aliquots suggested to be done for PC was included in sections 6, A1.3.1 and A2.3.1. Room temperature range was detailed in section 6. More precise conditions of sample transport and storage are specified in section 8.1. Further developed explanations of the PC, NC and EIC characteristics were added in section 11. Experimental LoD values were included in section 12.2, and further information about sequences homology $\geq 80\%$ for each primer and probe per target was included in Section 12.5.1 Analytical Specificity (<i>in silico</i> assays) / El usuario previsto se incluyó en el uso previsto. En la sección 3 se añadió la indicación de “ensayo no automatizado”, los clados detectados, la configuración de uso prevista y una explicación más desarrollada de las características de CP y CN. En las secciones 6, A1.3.1 y A2.3.1 se incluyó la indicación del número de alícuotas que se sugiere realizar para CP. En la sección 6 se especificó el rango de temperatura ambiente. En la sección 8.1 se especifican condiciones más precisas de transporte y almacenamiento de las muestras. En la sección 11 se añadieron explicaciones más desarrolladas de las características CP, CN y CIE. Los valores experimentales del LoD se incluyeron en la sección 12.2, y se incluyó más información sobre la homología de secuencias $\geq 80\%$ para cada primer y sonda, por diana, en la sección 12.5.1 Especificidad analítica (ensayos <i>in silico</i>).	
DRAFT.07	Software's and firmware's versions of the thermocyclers and automated extraction systems were included. Explanation of EIC results when Ct values are between 35-40 were included in the results interpretation table. Limitations regarding the operational temperature conditions to bear in mind, EIC results interpretation with Ct values between 35-40, and <i>in-silico</i> microbial interference were added. A new table with more detailed information about $\geq 80\%$ homologies between each primer or probe for all sequences evaluated was included in “Cross-reactivity <i>in silico</i> analysis section”. / Se incluyen las versiones de los <i>software</i> y <i>firmware</i> de los termocicladores y de los sistemas de extracción automática. Se añade una explicación sobre los resultados del CIE cuando los valores Ct se encuentran entre 35-40 en la tabla de interpretación de resultados. Se añaden limitaciones en relación con las condiciones de temperatura de trabajo que deben tenerse en cuenta, la interpretación de los resultados del CIE con valores Ct entre 35-40, y con la interferencia microbiana <i>in silico</i>. Se añade una nueva tabla en la sección de “Reactividad cruzada: ensayo <i>in silico</i>” con más información sobre las homologías $\geq 80\%$ entre cada primer o sonda para todas las secuencias evaluadas.	04/09/2025

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

Revision: 4th September 2025.

VIASURE

by **certest**



 **Certest Biotec, S.L.**
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1 50840,
San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

 **(+34) 976 520 354**

 **viasure@certest.es**

 **www.certest.es**

certest

F-566 rev.03

Modification rights reserved. All rights reserved. © Certest Biotec, S.L.
The products, services and data set out in this document may suffer changes
and/or variations on the texts and pictures shown.