



Protocole pour la détection du virus MONKEYPOX par PCR en temps réel

1 Extraction

Lyse externe (LSB3) : 200µl d'échantillon + 200µl de tampon de lyse (Kit Qiagen QIAamp DNA mini kit)
Extraction manuelle avec un volume d'élution de 200µl.

Kit QIAamp DNA mini kit : Ref :51304

Lot : 172023567

2 Kit PCR

Nom : *Mplex Monkeypox, Orthopox Real-time PCR*

Fabricant : Novatec Immundiagnostica GmbH

Mandataire : N/A

Fournisseur : GoldStandardDiagnostic

Marquage : RUO

Ref: PPOX6201

Manuel : PPOX6201_RUO_Rev01_2022-07-01

Température de conservation -22°C /-15°C.

LOT: PPOX6200-003 2022-12

Matrices : Oropharyngée, cutanéomuqueux, sang, sérum.....

Cibles	Fluorophore	Excitation	Emission
Cible 1	FAM	495 nm	515 nm
Cible 2	HEX	535 nm	555 nm
Cible 3	Cy5	650 nm	670 nm

3 Conditions

Thermocycler : BioRad OPUS96 ref : 795BR03596

Volume de mixe PCR : 13µl

Volume ADN : 7µl

Cycle :

Etape	Température	Temps	cycle
1	95°C	2 min	1 cycle
2	95°C	5 sec	
	60°C	30 sec *	40 cycles



Résultat :

N° de test : goldstandard_2022-08-02 09-19-33_795BR03596

Validation du Run

Contrôle positif		
Cible 1 (FAM) MPXV	Ct<38	Threshold : 4299.56
Cible 2 (HEX) Orthopoxvirus	Ct<38	Threshold : 3247.26
Cible 3 (Cy5) RNase P	Ct<38	Threshold : 633.09
Contrôle négatif		
Cible 1 (FAM) MPXV	Ct non déterminé	
Cible 2 (HEX) Orthopoxvirus	Ct non déterminé	
Cible 3 (Cy5) RNase P	Ct non déterminé	
	Ct non déterminé	
Echantillon		
Positif	Ct <38	
Négatif	Non détecté ou Ct >38	

Matrice :

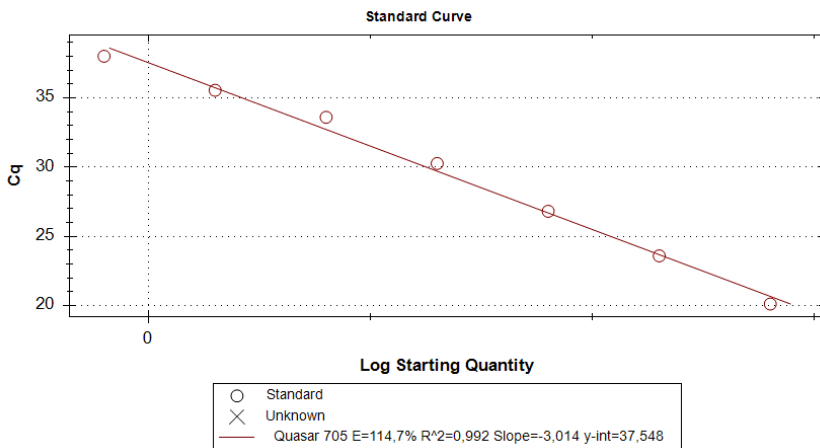
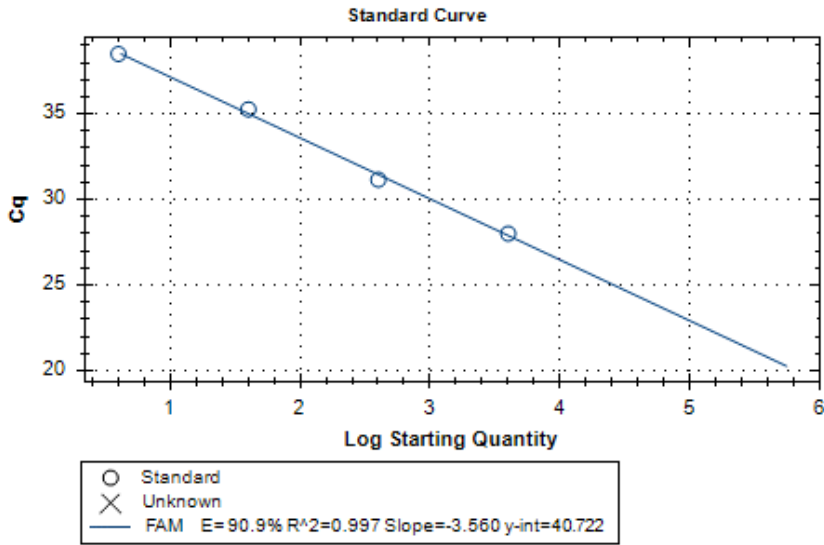
Sondes	MPXV High	MPXV Low	CPXV	NRT	Positive Control du Kit	Negative control du Kit
Cible 1 (FAM) MPXV	20.28	36.45	ND	ND	26.06	
Cible 2 (HEX) Orthopoxvirus	21.11	36.85	30.43	ND	26.67	ND
Cible 3 (Cy5) RNase P	25.06	28.19	ND	ND	ND	ND
PCR-CNR-LE OPV	19.6	36.5	ND	ND	NA	NA

ND : Non détecté

Gamme :

MPXV CNR2211C P2 Vero du 07/06/2022 Titre 4E6 PFU/ml

	10-3	10-4	10-5	10-6
PFU/ml	4000	400	40	4
MPXV (FAM)	28.01	31.16	35.27	38.51
OPV (HEX)	28.53	31.84	35.85	38.74
PCR-CNR-LE OPV	26.81	30.26	33.60	35.55



CONCLUSION

Le témoin positif et le témoin négatif ont été validés, permettant l'interprétation des résultats.

Le kit détecte les échantillons primaires MPXV, Ct précoce et tardif.

Le kit ne détecte pas l'ADN du virus CPXV avec la sonde MPXV, (détection avec la sonde orthopoxvirus)

Le Kit permet une détection jusqu'à une équivalence de 4 PFU/ml d'ADN issu d'un surnageant de culture de MPXV.

KIT validé.