



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)

Contrôle interne : 10µl de SPCY 1/100.

Extraction manuelle avec un volume d'élution de 200µl.

Kit QIAamp DNA mini kit : Ref :51304

Lot : 172023567

2 Kit PCR

Nom : *Monkeypox virus Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)*

Fabricant : Sansure Biotech,

Fournisseur : NOVEOX

Marquage : CE IVD

Ref : **S3352E**

Manuel : S3352E Version V00 Date de revision 21/05/2022

Température de conservation -25/-15°C.

LOT: KY202206001

Matrices : Ecouvillon naso-oro-pharyngé, sang/sérum/ exsudat de lésion /croûte.

Cibles	Fluorophore	Excitation	Emission
Monkeypox (MPXV)	FAM	495 nm	515 nm
Contrôle interne (CI)	Cy5	650 nm	670 nm

3 Conditions

Thermocycler : BioRad OPUS96 ref : 795BR03596

Volume de mixe PCR : 40µl

Volume ADN : 10µl

Cycle :

Etape	Température	Temps	cycle
1	50°C	2min	1 cycle
2	95°C	5sec	1 cycle
3	95°C	5 sec	
	60°C	16 sec*(FAM-VIC)	41 cycles



Résultat :

N° de test : biopharma_perfectus_bis_2022-07-07 08-55-57_795BR03596

Validation du Run

Contrôle positif		
FAM	Ct<35	Threshold : 1900.96
Cy5	Ct<35	Threshold : 327.05
Contrôle négatif		
FAM	Ct >40 ou NI	
Cy5	Ct >40 ou NI	
Echantillon		
MPXV	Ct <40 = POSITIF	Ct>40 = NEGATIF
CI	Ct <40 = POSITIF	Ct>40 = NEGATIF

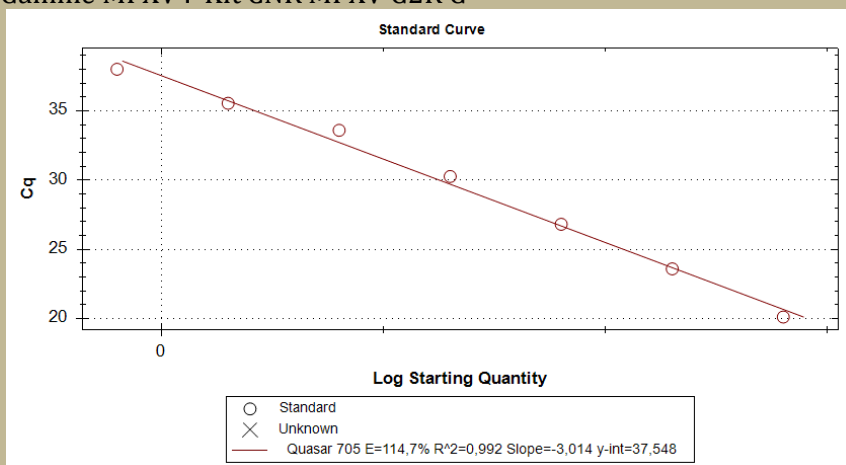
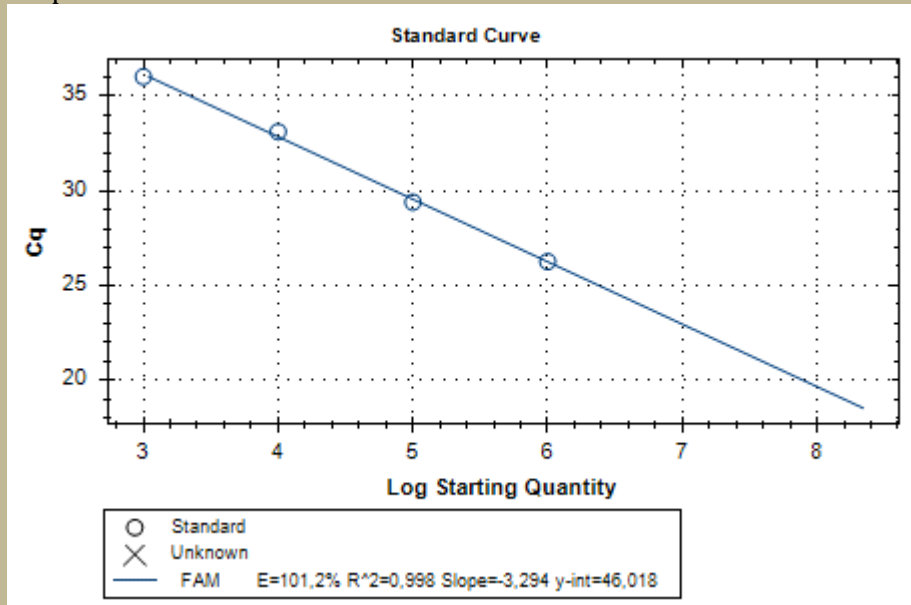
Matrice :

Sondes	MPXV High	MPXV Low	CPXV	NRT	Positive Control du Kit	Negative control du Kit
MPXV (FAM)	18.54	33.16	NI	NI	28.71	NI
CI (Cy5)	20.28	22.07	31.57	NI	30.49	NI
in house PCR	19.6	36.5	NI	NI	NA	NA

Gamme :

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

	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9	10-10
PFU/ml	4000	400	40	4	0.4	0.04	0.004	0.0004
MPXV (FAM)	26.27	29.4	33.11	36.01	NI	NI	NI	NI
CI (Cy5)	33.33	37.67	39.08	NI	NI	NI	NI	NI
in house PCR	26.81	30.26	33.60	35.55	38.01	NA	NA	NA



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.

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

Le kit permet une détection de l'ADN du virus MPXV, mais la limite de détection du kit est inférieure de 1 log au test PCR de référence.