



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 : *FlexStar Monkeypox virus PCR Detection Mix 1.5*

Fabricant : Altona

Fournisseur : Altona

Marquage : RUO

Ref : **FS0201503-FS0011515**

Manuel : **version 062022**

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

LOT: 037480-036585

Matrices : sérum/ exsudat de lésion.

Cibles	Fluorophore	Excitation	Emission
Monkeypox (MPXV)	FAM	495 nm	515 nm
IC	HEX	535 nm	555 nm
SC	Cy5	650 nm	670 nm

3 Conditions

Thermocycler : BioRad OPUS96 ref : 795BR03596

Volume de mixe PCR : 20µl

Volume ADN : 10µl

Cycle :

Etape	Température	Temps	cycle
RT	52°C	5min	1 cycle
1	95°C	5sec	1 cycle
2	95°C	5 sec	
	58°C	25 sec *	45 cycles



Résultat :

N° de test : ALTONA_MPXV_2022-07-22 15-10-38_795BR03596

Validation du Run

Contrôle positif		
FAM (MPXV)	Ct<45	Threshold : 1931.51
HEX (IC)	Ct<45 ou ND	Threshold : 666.26
Cy5 (SC)	Ct<45 ou ND	Threshold : 280.37
Contrôle négatif		
FAM (MPXV)	ND	
HEX (IC)	Ct<45	
Cy5 (SC)	Ct<45	
Echantillon		
POSITIF	Ct<45 (FAM) ; Ct<45 (HEX) ; Ct<45 (Cy5)	
NEGATIF	ND (FAM) ; Ct<45 (HEX) ; Ct<45 (Cy5)	

Matrice :

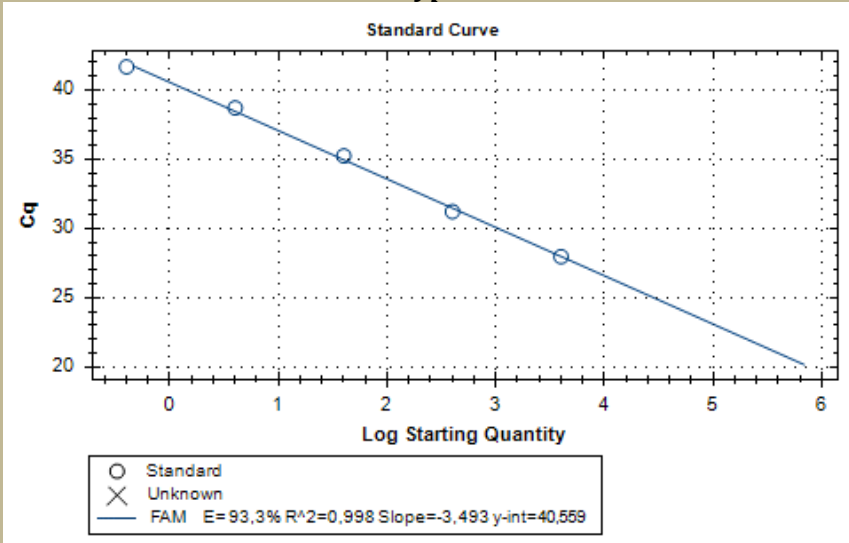
Sondes	MPXV High	MPXV Low	MPXV High +IC	MPXV Low +IC	CPXV	NRT	Positive Control du Kit	Negative control du Kit
FAM (MPXV)	20.16	36.31	20.89	22.32	ND	ND	32.13	ND
HEX (IC)	ND	ND	25.66	26.26	ND	ND	ND	29.60
Cy5 (SC)	24.60	27.07	28.25	34.76	ND	ND	32.42	ND
in house PCR	19.6	36.5	20.01	22.1	ND	ND	NA	NA

Gamme :

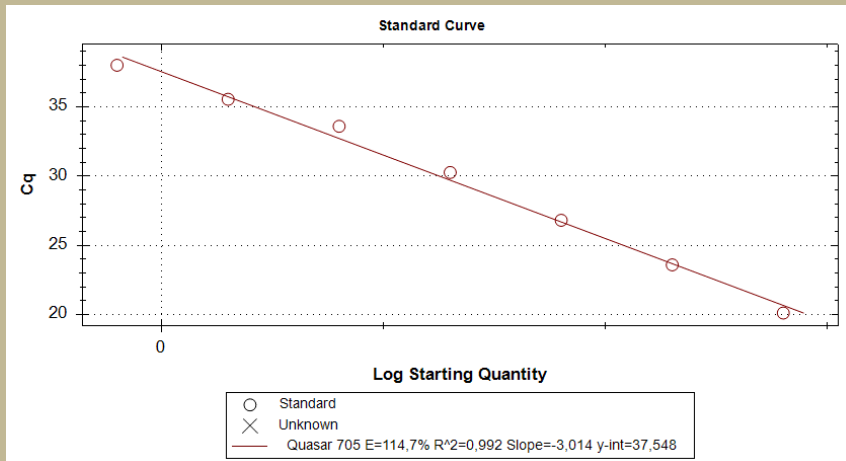
MPXV CNR2211C P2 Vero du 07/06/2022 Titre 4E6 PFU/ml

	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)	27.96	31.22	35.25	38.71	41.68	ND	ND	ND
in house PCR	26.81	30.26	33.60	35.55	38.01	ND	ND	ND

Gamme : MPXV : FlexStar Monkeypox virus PCR Detection Mix 1.5



Gamme MPXV : Kit CNR MPXV G2R G



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 0.4 PFU/ml d'ADN issu d'un surnageant de culture de MPXV.

KIT validé.