



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 : *EurobioPlex Monkeypox Screening Test*

Fabricant : Eurobio

Fournisseur : Eurobio

Marquage : RUO

Ref : **EBX-060-**

Manuel : **EBX-060-v1.00_RUO**

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

LOT: 300724 20221214

Matrices : sérum/ exsudat de lésion.

| Cibles | Fluorophore | Excitation | Emission |
|-----------------------|-------------|------------|----------|
| Monkeypox (MPXV) | FAM | 495 nm | 515 nm |
| Measles | HEX | 535 nm | 555 nm |
| VZV | Texas Red | 585 nm | 605 nm |
| Contrôle interne (CI) | Cy5 | 650 nm | 670 nm |

3 Conditions

Thermocycler : BioRad OPUS96 ref : 795BR03596

Volume de mixe PCR : 10µl

Volume ADN : 5µl

Cycle :

| Etape | Température | Temps | cycle |
|-------|-------------|----------|-----------|
| RT | 45°C | 5min | 1 cycle |
| 1 | 98°C | 20sec | 1 cycle |
| 2 | 98°C | 3 sec | |
| | 58°C | 10 sec * | 40 cycles |



Résultat :

N° de test : Eurobio_2022-07-05 11-24-40_795BR03596

Validation du Run

| | | |
|------------------|------------------|----------------------------------|
| Contrôle positif | | |
| FAM | Ct<32 | NI |
| HEX | Ct<32 | 20.59 |
| Texas Red | Ct<32 | 20.36 |
| Cy5 | Ct<32 | 21.84 |
| Contrôle négatif | | |
| FAM | Ct non déterminé | NI |
| HEX | Ct non déterminé | NI |
| Texas Red | Ct non déterminé | NI |
| Cy5 | Ct non déterminé | NI |
| Echantillon | | |
| MPXV | Ct + = POSITIF | Ct - = NEGATIF |
| CI | Ct +/- | Ct - = Interprétation impossible |

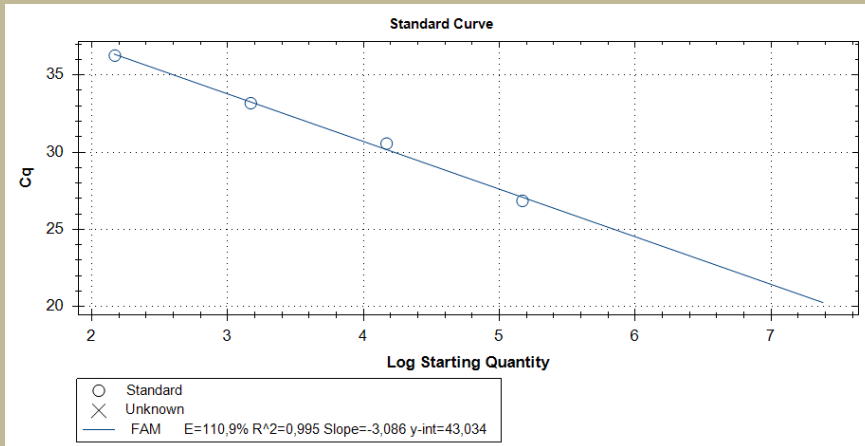
Matrice :

| Sondes | MPXV High | MPXV Low | CPIXV | NRT | Positive Control du Kit | Negative control du Kit |
|-----------------|-----------|----------|-------|-----|-------------------------|-------------------------|
| MPXV (FAM) | 18.87 | 37.96 | NI | NI | NI | NI |
| CI (VIC) | 26.37 | 28.03 | NI | NI | 21.84 | NI |
| Measles (HEX) | NI | NI | NI | NI | 20.59 | NI |
| VZV (Texas Red) | NI | NI | NI | NI | 20.36 | NI |
| in house PCR | 19.6 | 36.5 | NI | NI | NA | NA |

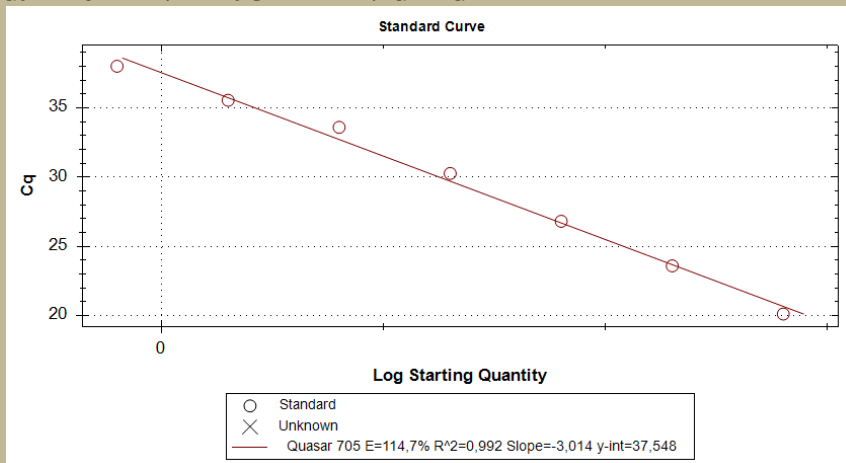
Gamme :

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) | 26.75 | 29.24 | 31.87 | 35.68 | NI | NI | NI | NI |
| in house PCR | 26.81 | 30.26 | 33.60 | 35.55 | 38.01 | NA | NA | NA |



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

KIT validé, mais la limite de détection du kit est inférieure de 1 log par rapport au test PCR de référence.