



## 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 :** *Monkeypox virus Real-time PCR Kit, RUO*

**Fabricant :** *NZYtech*

**Mandataire :** *NA*

**Fournisseur :** *Nzytech*

**Marquage :** *RUO*

Ref : MD04951

Manuel : V2201

Température de conservation -85°C /-15°C.

**LOT:** MD04951Y0071

Matrices : Lésions, sérums.

<b>Cibles</b>	<b>Fluorophore</b>	<b>Excitation</b>	<b>Emission</b>
Cible 1 (MPXV)	FAM	495 nm	515 nm
Cible 2 (MPXV+OPV)	HEX	535 nm	555 nm
Cible 3 (ACTB)	Cy5	650 nm	670 nm

### 3 Conditions

Thermocycler : BioRad OPUS96 ref : 795BR03596

Volume de mixe PCR : 12µl

Volume ADN : 8µl

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 : admin\_2022-08-11 15-02-53\_795BR03596\_Test Nzytech\_GFV\_20220811

**Validation du Run**

<b>Contrôle positif</b>		
Cible 1 (FAM)	Ct<35	
Cible 2 (HEX)	Ct<35	
Cible 3 (Cy5)	Ct<40	
<b>Contrôle négatif</b>		
Cible 1 (FAM)	Ct non déterminé	
Cible 2 (VIC)	Ct non déterminé	
Cible 3 (HEX)	Ct non déterminé	
Cible 4 (Texas Red)	Ct non déterminé	
<b>Echantillon</b>		
Positif	FAM Ct<35 ; HEX Ct <35 ; Cy5 Ct < 40	
Négatif	FAM Ct>35 ; HEX Ct>35 ; Cy5 Ct <40	

**Matrice :**

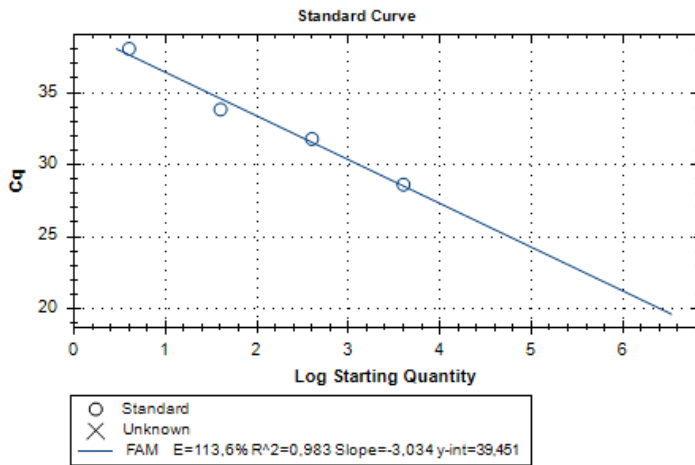
Sondes	MPXV High	MPXV Low	CPXV	NRT	Positive Control du Kit	Negative control du Kit
Cible 1 (FAM)	19.62	36.66	ND	ND	22.15	ND
Cible 2 (HEX)	19.77	36.48	27.74	ND	22.52	ND
Cible 3 (Cy5)	21.90	24.75	31.86	ND	20.43	ND
PCR-CNR-LE OPV	19.6	36.5	ND	ND	NA	NA

ND : Non détecté

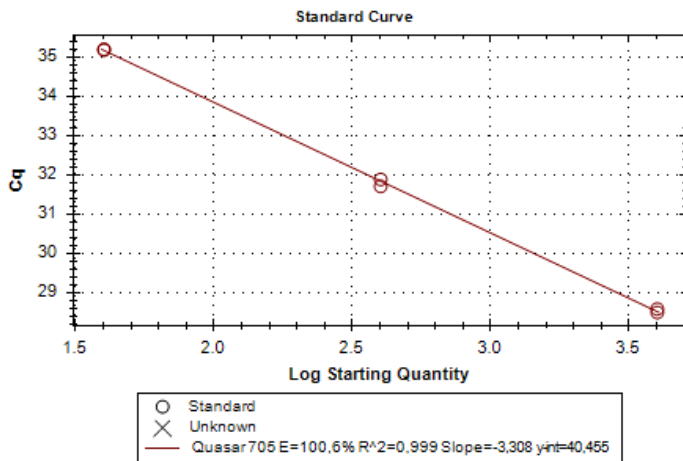
**Gamme :**

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)	28.62	31.79	33.84	38.05
PCR-CNR-LE OPV	28.53	31.84	35.25	36.50



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 détecte l'ADN du virus CPXV uniquement avec la sonde MPXV+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 pour la détection d'espèce Monkeypox.**