Primerdesign

R01421

Ébolavirus de Bundibugyo

Version du kit : 2

Région cible :
Gène de la nucléoprotéine (NP)

Kit genesig® Complete RNA
150 tests

GENESIG
Kits de Primerdesign

Utilisation réservée aux laboratoires et à la recherche uniquement.

Description du produit

Le kit de détection par qPCR genesig® Complete cible le gène de la nucléoprotéine (NP) de l'ébolavirus de Bundibugyo, également connu sous le nom de virus de Bundibugyo (BDBV). Le BDBV est un virus à RNA appartenant au genre Orthoebolavirus, identifié pour la première fois lors d'une épidémie survenue en 2007 dans le district de Bundibugyo, en Ouganda. Il est responsable de la maladie à virus de Bundibugyo (BVD), une forme grave et souvent mortelle de la maladie d'Ebola.

Le BDBV est un virus zoonotique dont les chauves-souris frugivores seraient le principal réservoir naturel. La transmission à l'homme peut résulter d'un contact étroit avec le sang ou les sécrétions corporelles d'animaux sauvages infectés, et la transmission interhumaine qui s'ensuit se produit par exposition directe à des fluides infectés ou à des surfaces contaminées. La période d'incubation peut varier de 2 à 21 jours, avec des symptômes précoces non spécifiques. Une identification rapide en laboratoire est donc essentielle pour lutter contre l'épidémie et assurer la veille sanitaire.

Spécificité

Ce kit est conçu pour la quantification in vitro des génomes de l'ébolavirus de Bundibugyo et offre un large profil de détection. Lors de sa conception, les amorces devaient permettre de détecter plus de 95 % des séquences disponibles dans la base de données du NCBI et présenter une homologie de 100 % avec les génomes publiés dans la base de données Pathoplexus, issus de l'épidémie de mai 2026.

Ce test n'est pas conçu pour détecter d'autres souches d'ébolavirus (Zaïre, Soudan, Tai Forest ou Reston).

En raison de la nature évolutive de la variation génétique, de nouvelles informations sur les séquences peuvent apparaître après la conception initiale du kit. Pour davantage d'informations ou pour toute question particulière concernant le profil de détection de ce kit, veuillez nous contacter par e-mail à l'adresse techsupport@primerdesign.co.uk ; notre équipe répondra à votre question.

Contenu du kit

Quantité	Composant	Tube	Couleur du bouchon
1	**Mélange amorces/sondes BDBV v2.0 (150 réactions)** Marquage FAM		MARRON
1	**Matrice du contrôle positif BDBV v2.0**		ROUGE
1	**Mélange amorces/sondes pour contrôle interne de l'extraction (150 réactions)** Marque VIC comme étalon		MARRON
1	**RNA pour contrôle interne de l'extraction (150 réactions)**		BLEU
1	**Mélange amorces/sondes pour contrôle endogène (150 réactions)** Marquage FAM. Cible : ACTB humain comme étalon		MARRON
3	**oasig®PLUS OneStep Lyophilised qPCR Master Mix (50 réactions par flacon en verre)**		DORÉ
4	**Tampon de remise en suspension oasig®** pour la remise en suspension du oasig®PLUS OneStep Lyophilised qPCR Master Mix (et du ROX lyophilisé, le cas échéant)		BLEU
1	**ROX lyophilisé oasig®** Colorant de référence passive ROX pouvant (le cas échéant) être ajouté au oasig®PLUS OneStep Lyophilised qPCR Master Mix.		MARRON
1	**Eau exempte de RNase et de DNase** pour la remise en suspension du mélange d'amorces/sondes		BLANC
3	**Tampon de préparation de la matrice** pour la remise en suspension de la matrice de contrôle interne, de la matrice de contrôle positif et la préparation de la courbe d'étalonnage		JAUNE

Réactifs et matériel à prévoir par l'utilisateur

Instrument de PCR en temps réel

Kit d'extraction

Ce kit est recommandé pour une utilisation avec le genesig® Easy DNA/RNA extraction kit ou le exsig®Mag. Il est toutefois conçu pour fonctionner efficacement avec tous les procédés permettant d'obtenir des acides nucléiques de haute qualité avec un taux minimal d'inhibiteurs de PCR.

Pipettes et embouts à filtres

Vortex et centrifugeuse

Microtubes de 1,5 ml

Plaques ou tubes de réaction qPCR

Stockage et stabilité du kit

Ce kit est stable pendant le transport à température ambiante, mais doit être conservé à -20 °C dès sa réception. Une fois les composants lyophilisés remis en suspension, ils ne doivent pas être exposés à des températures supérieures à -20 °C pendant plus de 30 minutes d'affilée, et les cycles de congélation/décongélation répétés et inutiles doivent être évités. Dans ces conditions, le kit reste stable pendant six mois à compter de la date de remise en suspension.

Si une série de dilutions pour courbe d'étalonnage est préparée, celle-ci peut être conservée au congélateur pendant une période prolongée. Si vous constatez une dégradation de cette série de dilutions, une nouvelle courbe d'étalonnage peut être établie à partir du contrôle positif.

Primer Design Ltd déconseille l'utilisation du kit après la date de péremption indiquée sur l'emballage.

Échantillons compatibles

Ce kit peut être utilisé avec tous les types d'échantillons, quelle que soit leur origine. Veuillez vous assurer que les échantillons d'acide nucléique extraits sont adaptés en termes de pureté, de concentration et d'intégrité du RNA. Un contrôle interne de l'extraction est fourni pour détecter la présence d'inhibiteurs non spécifiques de la PCR.

Plage dynamique du test

Le kit présente une limite de détection de 5 copies de la matrice cible par réaction et il permet d'atteindre des efficacités d'amplification comprises entre 90 et 110 % dans des conditions de PCR optimales. Si une efficacité comprise entre 90 % et 110 % n'est pas atteinte lors de la réalisation d'une courbe d'étalonnage avec un contrôle positif pour une analyse quantitative, il convient de répéter l'essai avec une courbe d'étalonnage fraîchement préparée.

Principes du test

PCR en temps réel

Un mélange amorces/sondes spécifique à la cible est fourni ; il peut être détecté via le canal FAM.

Le mélange amorces/sondes fourni exploite le principe dit « TaqMan® ». Au cours de l'amplification par PCR, les amorces sens et antisens s'hybrident au DNAc cible. Une sonde fluorogénique est incluse dans le même mélange réactionnel ; elle se compose d'une sonde de DNA marquée par un fluorophore en position 5′ et d'un extincteur en position 3′. Au cours de l'amplification par PCR, la sonde est clivée, ce qui sépare le fluorophore et l'extincteur. L'augmentation de la fluorescence qui en résulte peut être détectée sur diverses plateformes de qPCR.

Contrôle positif

Le kit contient une matrice de contrôle positif destinée à la détermination du nombre de copies et servant de contrôle positif pour le montage PCR. Celle-ci peut être utilisée pour établir une courbe étalon du nombre de copies de la cible en fonction de la valeur Cq. Il est également possible d'utiliser le contrôle positif à une dilution unique lorsque l'analyse quantitative complète des échantillons n'est pas nécessaire. À chaque utilisation du kit, au moins une réaction de contrôle positif doit être incluse dans la série. Un résultat positif indique que les amorces et les sondes destinées à détecter le gène cible ont correctement fonctionné dans ce cadre expérimental particulier. Si un résultat négatif est obtenu, les résultats du test ne sont pas valides et doivent être répétés. Une attention particulière doit être portée afin que le contrôle positif ne contamine aucun autre composant du kit, ce qui entraînerait des résultats faussement positifs. Cette précaution peut être respectée en manipulant ce composant dans un environnement post-PCR. Une attention particulière doit également être portée à la prévention de toute contamination croisée avec d'autres échantillons lors de l'ajout du contrôle positif à la série de tests. Cette précaution peut être respectée en scellant tous les autres échantillons et contrôles négatifs avant de pipeter le contrôle positif dans le puits dédié au contrôle positif.

Contrôle négatif

Afin de valider tout résultat positif, une réaction de contrôle négatif doit être réalisée à chaque utilisation du kit. Pour cette réaction, une eau exempte de RNase et de DNase doit être utilisée à la place de la matrice. Un résultat négatif indique que les réactifs n'ont pas été contaminés lors de la préparation de la série. Ce contrôle est également appelé « No Template Control » (NTC).

Contrôle interne de l'extraction du RNA

Lors de l'extraction du RNA, il est souvent préférable de disposer d'une source exogène de matrice RNA ajoutée au tampon de lyse. Ce RNA de contrôle est ensuite purifié conjointement avec le RNA de l'échantillon et peut être détecté en tant que contrôle positif du processus d'extraction. La réussite de la purification conjointe et de la qPCR avec le RNA de contrôle indique également que les inhibiteurs de PCR ne sont pas présents à une concentration élevée.

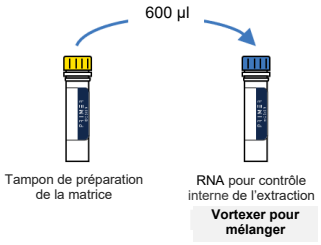
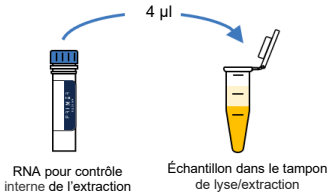
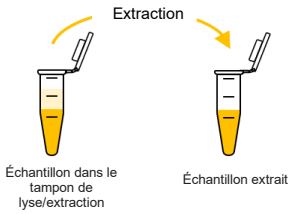
Un mélange distinct amorces/sondes est fourni avec ce kit pour détecter le RNA exogène par qPCR. Les amorces sont présentes à des concentrations limitantes pour la PCR, ce qui permet un multiplexage avec les amorces de la séquence cible. L'amplification du RNA de contrôle n'interfère pas avec la détection du RNA cible, même lorsque celui-ci est présent en faible nombre de copies. Le contrôle interne est détecté via le canal VIC et donne une valeur Cq de 28 ± 3, en fonction du degré de dilution de l'échantillon.

Contrôle endogène

Le kit contient un mélange amorces/sondes pour la détection du gène de contrôle endogène, ce qui permet de confirmer la validité d'un échantillon biologique provenant de l'hôte. La détection du contrôle endogène s'effectue via le canal FAM, il n'est donc PAS possible de réaliser une réaction multiplexe avec le mélange amorces/sondes spécifique à la cible. L'amplification du contrôle endogène peut dépendre du type d'échantillon utilisé. Veuillez noter que si des échantillons provenant d'une espèce différente sont utilisés, le contrôle endogène peut ne pas être adapté, mais il est recommandé d'utiliser le contrôle interne de l'extraction.

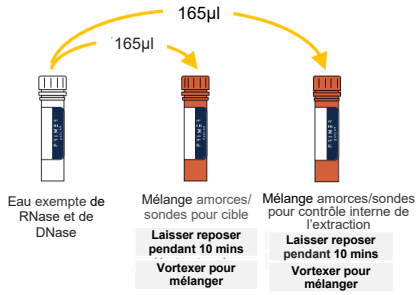
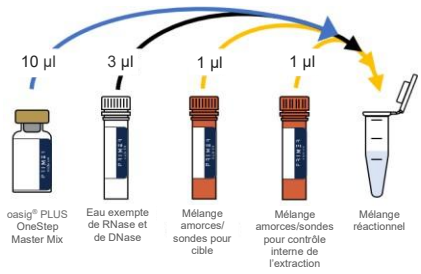
Flux de travail avec le genesig® Complete RNA

1. Préparation des échantillons

A) Remettre en suspension le contrôle interne	**B)** Ajouter à l'échantillon dans le tampon de lyse/extraction*	**C)** Extraire le(s) échantillon(s) selon le protocole choisi
		

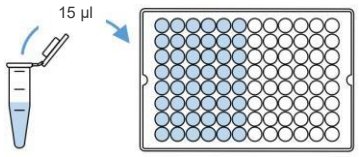
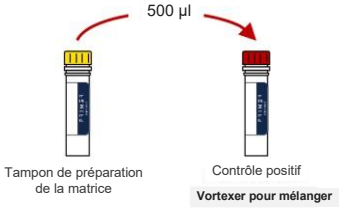
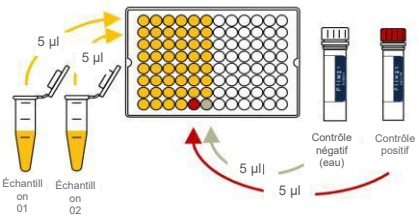
* REMARQUE : NE PAS ajouter le RNA pour contrôle interne de l'extraction directement à l'échantillon biologique non traité, car cela entraînerait sa dégradation et une perte de signal.

2. Préparation du mélange réactionnel

A) Remettre en suspension le mélange amorces/sondes	**B)** Remettre en suspension le Master Mix oasig®	**C)** Combiner pour obtenir le mélange réactionnel**
		

** REMARQUE : Les quantités indiquées sont les quantités nécessaires pour chaque réaction. Multipliez chaque volume par le nombre de réactions requises, incluant un surplus.

3. Préparation de la plaque

A) Ajouter 15 µl de mélange réactionnel dans chaque puits	**B)** Remettre en suspension le contrôle positif	**C)** Ajouter 5 µl de(s) échantillon(s) dans le(s) puits.
		

Protocole de remise en suspension

Afin de réduire au minimum le risque de contamination par du RNA/DNA étranger, nous recommandons d'effectuer toutes les opérations de pipetage dans un environnement conforme aux normes de PCR. Idéalement, il s'agirait d'un laboratoire dédié à la PCR ou d'une armoire de PCR. L'utilisation d'embouts à filtres est recommandée pour toutes les étapes de pipetage.

1. **Centrifuger brièvement chaque tube avant de l'ouvrir.**
   Cette opération permet de maintenir le mélange amorces/sondes lyophilisé ou la matrice au fond du tube et d'éviter toute perte lors de l'ouverture.

2. **Remettre en suspension les mélanges amorces/sondes dans l'eau exempte de RNase et de DNase fournie, conformément au tableau ci-dessous :**
   Pour garantir une remise en suspension complète, laisser le mélange amorces/sondes se réhydrater pendant 10 minutes à température ambiante. Vortexer soigneusement chaque tube, puis pipeter de haut en bas 10 fois.
   Un mélange incorrect peut réduire les performances du kit.

Composant – remettre en suspension dans l'eau	Volume
Paquet pré-PCR	
Mélange amorces/sondes BDBV v2.0 (**MARRON**)	165 µl
Mélange amorces/sondes pour contrôle interne de l'extraction (**MARRON**)	165 µl
Mélange amorces/sondes pour contrôle endogène (**MARRON**)	165 µl

3. **Remettre en suspension le oasig®PLUS OneStep Lyophilised qPCR Master Mix dans le tampon de remise en suspension oasig®, conformément au tableau ci-dessous :**

Composant – remettre en suspension dans le tampon de remise en suspension oasig®	Volume
oasig®PLUS OneStep Lyophilised qPCR Master Mix (**DORÉ**)	525 µl

Veuillez noter : Si le kit est destiné à être utilisé avec des plateformes employant le ROX comme colorant de référence passive, veuillez vous reporter au Protocole de manipulation du colorant de référence passive ROX figurant à la fin du présent manuel.

4. **Remettre en suspension la matrice du contrôle interne et la matrice du contrôle positif dans le tampon de préparation des matrices fourni, conformément au tableau ci-dessous :**
   Pour garantir une remise en suspension complète, vortexer soigneusement chaque tube.

Composant – remettre en suspension dans le tampon de préparation des matrices	Volume
Feuille thermosoudée pré-PCR	
RNA pour contrôle interne de l'extraction (**BLEU**)	600 µl
Feuille thermosoudée post-PCR	
Matrice du contrôle positif BDBV v2.0 (**ROUGE**)*	500 µl

* Ce composant contient une matrice à nombre de copies élevé et présente un risque de contamination TRÈS important. Il doit être ouvert et manipulé dans un espace séparé du laboratoire, à l'écart des autres composants.

Extraction du RNA

Le RNA pour contrôle interne de l'extraction peut être ajouté soit au tampon de lyse/extraction du RNA, soit à l'échantillon de RNA une fois celui-ci remis en suspension dans le tampon de lyse.

NE PAS ajouter le RNA pour contrôle interne de l'extraction directement à l'échantillon biologique non traité, car cela entraînerait sa dégradation et une perte de signal.

1. **Ajouter 4 µl du RNA pour contrôle interne de l'extraction (BLEU) à chaque échantillon dans le tampon de lyse/extraction de RNA.**
2. **Procéder à l'extraction du RNA conformément aux protocoles du fabricant.**

Protocole de détection par OneStep RT-qPCR

Pour des performances et une sensibilité optimales.
Toutes les étapes de pipetage et la préparation des plaques expérimentales doivent être effectuées sur de la glace. Une fois la plaque préparée, passer immédiatement au protocole d'amplification OneStep. Une incubation prolongée des mélanges réactionnels à température ambiante peut entraîner l'apparition d'artefacts de PCR qui réduisent la sensibilité de la détection.

1. **Pour chaque échantillon de RNA, préparer un mélange réactionnel conformément au tableau ci-dessous :**
   Prévoir un nombre suffisant de réactions incluant les contrôles positifs et négatifs.

Composant	Volume
oasig®PLUS OneStep Lyophilised qPCR Master Mix (DORÉ)	10 µl
Mélange amorces/sondes BDBV **v2.0** (**MARRON**)	1 µl
Mélange amorces/sondes pour contrôle interne de l'extraction (**MARRON**)	1 µl
Eau exempte de RNase et de DNase (BLANC)	3 µl
Volume final	**15 µl**

2. **(Facultatif : si vous souhaitez lancer une réaction de contrôle endogène pour chaque échantillon, vous devrez acheter du Master Mix supplémentaire à cet effet). Pour chaque échantillon de RNA, préparer une réaction de contrôle endogène conformément au tableau ci-dessous.**
   Cette réaction de contrôle fournit des informations utiles sur la qualité de l'échantillon biologique.

Composant	Volume
oasig®PLUS OneStep Lyophilised qPCR Master Mix (DORÉ)	10 µl
Mélange amorces/sondes pour contrôle endogène (**MARRON**)	1 µl
Eau exempte de RNase et de DNase (BLANC)	4 µl
Volume final	**15 µl**

3. **Pipeter 15 µl de ces mélanges dans chaque puits, conformément à la configuration de votre plaque d'expérimentation.**

4. **Pipeter 5 µl de la matrice RNA dans chaque puits, conformément à la configuration de votre plaque d'expérimentation.**
   Pour les puits de contrôle négatif, utiliser 5 µl d'eau exempte de RNase et DNase (BLANC). Pour les puits de contrôle positif, utiliser 5 µl de la matrice du contrôle positif (**ROUGE**). Le volume final dans chaque puits est de 20 µl.

5. **(Facultatif) Préparation de la courbe d'étalonnage pour l'analyse quantitative.**
   Pour l'analyse quantitative des échantillons, une série de dilutions peut être préparée à partir de la matrice du contrôle positif afin d'établir une courbe d'étalonnage (**ROUGE**). Cette étape n'est pas nécessaire pour une analyse qualitative.

   5.1 Préparation du mélange réactionnel pour la courbe d'étalonnage.
   Prévoir un nombre suffisant de réactions pour inclure chaque dilution de la courbe d'étalonnage.

Composant	Volume
oasig®PLUS OneStep Lyophilised qPCR Master Mix (**DORÉ**)	10 µl
Mélange amorces/sondes BDBV v2.0 (**MARRON**)	1 µl
Eau exempte de RNase et de DNase (**BLANC**)	4 µl
Volume final	**15 µl**

   5.2 Préparation d'une série de dilutions au 10ème pour courbe d'étalonnage.
   - **a.** Pipeter 90 µl de tampon de préparation de la matrice (**JAUNE**) dans 5 tubes et les étiqueter de 2 à 6. Le tube contenant le contrôle positif pur (**ROUGE**) est considéré comme le tube 1.
   - **b.** Pipeter 10 µl de matrice du contrôle positif (**ROUGE**) dans le tube 2.
   - **c.** Vortexer soigneusement.
   - **d.** Changer l'embout de la pipette puis pipeter 10 µl du tube 2 dans le tube 3.
   - **e.** Vortexer soigneusement.

   Répéter les étapes (d) et (e) pour compléter la série de dilutions.

Courbe d'étalonnage	Nombre de copies
Tube 1 Contrôle positif (**ROUGE**)	2 x 10^5 par µl
Tube 2	2 x 10^4 par µl
Tube 3	2 x 10^3 par µl
Tube 4	2 x 10^2 par µl
Tube 5	20 par µl
Tube 6	2 par µl

   5.3 Pipeter 15 µl de mélange réactionnel et 5 µl de l'étalon correspondant dans chaque puits pour établir la courbe d'étalonnage, conformément à la configuration de votre plaque.
   Le volume final dans chaque puits est de 20 µl.

Protocole d’amplification par OneStep RT-qPCR

Conditions d’amplification recommandées lors de l’utilisation du oasig®PLUS OneStep Lyophilised qPCR Master Mix.

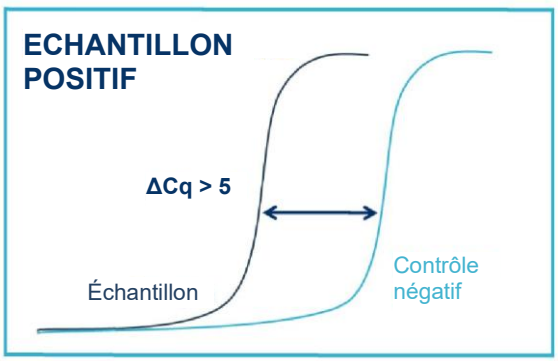
	Étape	Temps	Température
	Transcription inverse	10 min	55 °C
	Activation enzymatique	2 min	95 °C
Cycle x50	Dénaturation	10 s	95 °C
	COLLECTE DES DONNÉES*	60 s	60 °C

* Les données de fluorescence doivent être collectées pendant cette étape via les canaux FAM et VIC

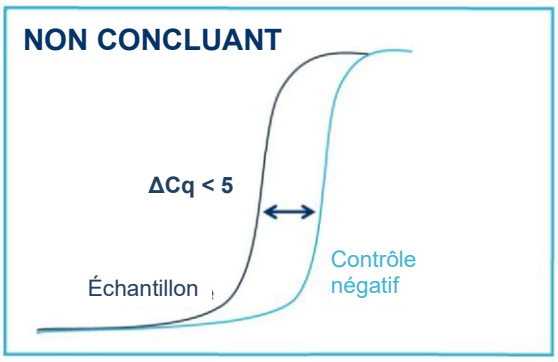
Interprétation des résultats

Cible (FAM)	Contrôle interne (VIC)	Contrôle positif	Contrôle négatif	Interprétation
≤ 30	+/-	+	-	**RESULTAT POSITIF QUANTITATIF** Calculer le nombre de copies
> 30	+	+	-	**RESULTAT POSITIF QUANTITATIF** Calculer le nombre de copies
> 30	-	+	-	**RESULTAT POSITIF QUALITATIF** Ne pas indiquer le nombre de copies, car le résultat peut être dû à une mauvaise extraction de l'échantillon.
-	+	+	-	**RESULTAT NEGATIF**
+/-	+/-	+	≤ 35	**ECHEC DE L'EXPERIENCE** en raison de la contamination du test
+/-	+/-	+	> 35	*
-	-	+	-	**ECHEC DE LA PREPARATION DE L'ECHANTILLON**
+/-	+/-	-	+/-	**ECHEC DE L'EXPERIENCE**

* Lorsque l'échantillon testé est positif et que le contrôle négatif est positif avec un Cq > 35, l'échantillon doit être réinterprété en fonction de l'intensité relative du signal des deux résultats :



Si l'échantillon présente une amplification > 5 Cq plus précoce que le contrôle négatif, il convient alors de réinterpréter les résultats de cet échantillon (à l'aide du tableau ci-dessus), en considérant le contrôle négatif comme effectivement négatif.



Si l'échantillon présente une amplification < 5 Cq plus précoce que le contrôle négatif, le résultat positif de l'échantillon est invalidé et le résultat doit être considéré comme non concluant en raison d'une contamination du test. Le test doit être refait pour cet échantillon.

Contrôle positif

L'amplification de la matrice du contrôle positif est attendue entre Cq 16 et 23 sur le canal FAM. Une non-conformité à ce critère de contrôle qualité indique clairement que l'expérience a été compromise et qu'elle doit être refaite.

Contrôle interne de la PCR

La valeur Cq obtenue avec le contrôle interne peut varier considérablement en fonction de l'efficacité de l'extraction, de la quantité de RNA ajoutée à la réaction PCR et des paramètres spécifiques à chaque équipement. Des valeurs de Cq de 28 ± 3 se situent dans la norme. Lors de l'amplification d'un échantillon cible présentant un nombre élevé de copies du génome, il se peut que le contrôle interne de l'extraction ne produise pas de courbe d'amplification. Ce résultat n'invalide pas le test et doit être interprété comme un résultat expérimental positif.

Contrôle endogène

Le signal obtenu à partir de l'ensemble amorces/sondes du contrôle endogène varie en fonction de la quantité de matériel biologique présente dans un échantillon donné. Un signal précoce indique la présence d'un bon rendement en matériel biologique. Un signal tardif suggère que l'échantillon contient peu de matériel biologique.

Protocole de manipulation du colorant de référence passive ROX

Le ROX est recommandé pour les plateformes qui l'utilisent comme colorant de référence passive. Consultez le tableau ci-dessous pour vérifier si l'ajout de ROX est nécessaire pour votre plateforme matérielle. Si le ROX est nécessaire, suivez les instructions ci-dessous.

- Remettre en suspension le ROX lyophilisé **(MARRON)** dans le volume approprié de tampon de remise en suspension oasig® **(BLEU)**, conformément au tableau ci-dessous.
- Ajouter le ROX remis en suspension dans chaque flacon de Master Mix selon le volume indiqué.

Plateforme de PCR en temps réel	Volume de remise en suspension du ROX	ROX à ajouter par flacon de Master Mix
Plateformes Applied Biosystems 7700, 7000, et 7900, 7300 StepOne, StepOnePLUS et ViA7, Roche capillary Lightcyclers	100 µl	20 µl
Toutes les plateformes Stratagene	200 µl	15 µl
Plateforme Applied Biosystems 7500 Quantstudio™	700 µl	10 µl
Toutes les autres équipements	NON REQUIS	NON REQUIS

Une fois que le colorant de référence passive ROX a été ajouté au oasig®PLUS OneStep Lyophilised qPCR Master Mix (**DORÉ**), poursuivre le reste du protocole.

Avis et clauses de non-responsabilité

Ce produit est développé, conçu et commercialisé exclusivement pour la recherche. Il n'est pas destiné à un usage diagnostique ou thérapeutique chez l'homme, ni à être administré à des êtres humains, sauf accord explicite de la Food and Drug Administration aux États-Unis ou des autorités réglementaires compétentes du pays d'utilisation. Pendant la période de garantie, les kits de détection genesig® de Primer Design Ltd permettent d'obtenir des données précises et reproductibles, tout en offrant une excellente sensibilité. En cas de données obtenues en violation des directives générales des Bonnes pratiques de laboratoire (GLP) et des recommandations du fabricant, toute garantie cesse d'être valable.

Marques

genesig® est une marque déposée de Primer Design Ltd.
oasig® est une marque de Primer Design Ltd.
exsig®Mag est une marque de Primer Design Ltd.