



VIROTYPE[®] BVDV

Gebrauchsinformation

Real-time RT-PCR Testkit zum Nachweis des Bovinen Virusdiarrhoe-Virus

in vitro-Diagnostikum für Tiere

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17c TierSG zugelassen.

Zulassungs-Nr.: FLI-B 451

VIROTYPE [®] BVDV	25 Reaktionen	Artikelnummer	05-101/25
VIROTYPE [®] BVDV	96 Reaktionen	Artikelnummer	05-101/96
VIROTYPE [®] BVDV	480 Reaktionen	Artikelnummer	05-101/480

Verwendungszweck

Die Produktgruppe VIROTYPE[®] umfasst Testsysteme zum Nachweis von pathogenen Viren mittels real-time PCR. VIROTYPE[®] BVDV ermöglicht den Nachweis des Erregers der Bovinen Virusdiarrhoe bzw. der Mucosal Disease mittels real-time RT-PCR in Vollblut, Plasma, Serum, Milch und Ohrgewebeprobe (Einzel- oder Poolproben) vom Rind.

Herstellung & Support:

LDL - Labor Diagnostik GmbH Leipzig
 Deutscher Platz 5b | 04103 Leipzig | Germany
 Phone +49 (0)341/12454 0 | Fax +49 (0)341/12454 60
 info@lab-leipzig.de | www.lab-leipzig.de



Allgemeine Informationen

Die Bovine Virusdiarrhoe (BVD) und die Mucosal Disease (MD) werden durch das Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV I, II) ausgelöst. BVDV ist ein einzelsträngiges RNA-Virus und gehört zur Gattung der Pestiviren, wie auch das Virus der klassischen Schweinepest und das Border Disease Virus.

BVD zählt weltweit zu den wirtschaftlich bedeutendsten Infektionskrankheiten des Rindes. Eine BVDV-Infektion kann in Abhängigkeit vom Immunstatus der Tiere zu unterschiedlich schweren gastrointestinalen und respiratorischen Erkrankungen sowie zu reproduktiven Problemen führen. Letztere entstehen durch die transplazentare Infektion des Fötus, die zu Aborten, Missbildungen und bei Infektion immuntoleranter Feten zur Geburt persistent infizierter Kälber (PI-Tiere) führt.

PI-Tiere (Virämiker) entstehen ausschließlich pränatal, eine postnatale Infektion mit dem BVDV führt zur transienten Virämie, die die Bildung neutralisierender Antikörper induziert. Unentdeckte PI-Tiere gelten als die wichtigsten Faktoren für die Verbreitung des BVDV, da sie zeitlebens hohe Konzentrationen an Virus ausscheiden und somit durch eine Neuinfektion trächtiger Rinder zur Entstehung weiterer PI-Tiere beitragen. Dem rechtzeitigen Auffinden solcher PI-Tiere kommt daher eine entscheidende Bedeutung bei der Bekämpfung der Seuche zu.

Durch seine hohe Sensitivität ermöglicht VIROTYPE® BVDV den sicheren und frühzeitigen Nachweis des Erregers sowohl in Einzel- als auch in Poolproben bis zu einer Größe von 50 Einzelproben für Vollblut, Plasma, Serum, bis zu 100 Einzelproben für Milch bzw. 25 Einzelproben für Ohrgewebe.

Beschreibung des Testprinzips

VIROTYPE® BVDV enthält alle Reagenzien zum Nachweis von RNA des BVDV sowie Positiv- und Negativkontrolle.

Die Reverse Transkription (RT) der viralen RNA und die anschließende Amplifikation der cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen in einem Ansatz, so dass die Gefahr von Kontaminationen minimiert ist. Die Reporter der Sonden emittieren Fluoreszenz proportional zur Menge des gebildeten Amplifikats. Dadurch kann die Reaktion in Echtzeit verfolgt werden (real-time PCR). Falsch negative Ergebnisse werden durch das Mitführen einer internen Kontrolle ausgeschlossen.

VIROTYPE® BVDV verwendet eine Primer-Sonden-Kombination spezifisch für Pestiviren (FAM-Fluoreszenz) sowie eine Primer-Sonden-Kombination für die interne Kontrolle (HEX-Fluoreszenz).

Inhalt	25 Reaktionen	96 Reaktionen	480 Reaktionen
PCR-Mix (gelbe Verschlusskappe) inkl. Primer, Sonden und interner Kontrolle	560 µl	2 x 1 ml	6 x 1,65 ml
Enzym-Mix (grüne Verschlusskappe)	7,5 µl	26 µl	2 x 65 µl
Positivkontrolle (rote Verschlusskappe)	25 µl	50 µl	2 x 50 µl
Negativkontrolle (blaue Verschlusskappe)	25 µl	50 µl	1 x 100 µl

Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien sind nach Erhalt sofort bei -20 °C lichtgeschützt zu lagern. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Testkit bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Verpackungsetikett) haltbar. Abgelaufene Testkits dürfen nicht mehr benutzt werden.

Der Testkit kann viermal eingefroren und aufgetaut werden.

Zusätzlich benötigte Materialien

- RNA-Extraktionskit
- Pipetten (0,5 µl – 1000 µl)
- Sterile, Aerosol-resistente Filterspitzen
- Sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Tischzentrifuge
- Optische Reaktionsplatte, 96 Kavitäten bzw. optische Reaktionsröhrchen
- Optische Abdeckfolie oder entsprechende Deckel
- Real-time PCR Gerät: z. B. Stratagene Mx3000P, Mx3005P, ABI PRISM 7000, 7500 und vergleichbare Geräte

Warenzeichen und Patente

VIROTYPE® ist ein eingetragenes Warenzeichen.

Die PCR ist patentrechtlich geschützt. Der Kauf dieses Produktes berechtigt den Käufer zur Verwendung dieses Produkts zur Durchführung von veterinärmedizinischen *in vitro* Tests unter bestimmten Roche-Patenten. Eine allgemeine Patent- oder sonstige Lizenz, welche über vorgenanntes Nutzungsrecht des Käufers dieses Produkts hinausgeht, wird nicht gewährt.

Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Den Test sollten nur für Labortätigkeit qualifizierte und speziell geschulte Personen ausführen. Die Bestandteile des Testkits dürfen nicht verunreinigt und nicht mit Bestandteilen aus anderen Chargen vermischt werden. Probenvorbereitung und Amplifikation sollten in getrennten Räumlichkeiten stattfinden.

Beachten Sie die Sicherheitsbestimmungen für das Arbeiten in Laboratorien und halten Sie die Regeln der Good Laboratory Practice (GLP) ein. Bitte tragen Sie Handschuhe. Der PCR-Mix enthält Natriumazid (NaN₃) in einer Konzentration < 0,1 %.

Alle Reste von Proben und mit Proben in Berührung gekommene Gegenstände sind als potenziell infektiöse Materialien zu dekontaminieren bzw. zu entsorgen.

**Die Einhaltung des vorgeschriebenen Protokolls (s. Seite 5) ist unbedingt erforderlich.
Nur für den tierärztlichen Gebrauch!**

Probenmaterial

VIROTYPE® BVDV ist geeignet zum Nachweis von RNA des BVDV aus folgenden Probenmaterialien vom Rind: Vollblut, Plasma, Serum, Milch und Ohrgewebe.

Nach Möglichkeit sollte EDTA-Plasma verwendet werden, da hier der Abbau der viralen RNA minimiert ist. Aufgrund der hohen Sensitivität des Tests können Blutproben (Vollblut, Plasma, Serum) in Pools aus bis zu 50 Einzelproben, Milchproben in Pools aus bis zu 100 Einzelproben und Ohrgewebeproben in Pools aus bis zu 25 Einzelproben getestet werden. Die optimale Poolgröße hängt jedoch von der BVDV-Prävalenz im untersuchten Gebiet und vom Alter der Tiere ab.

RNA-Extraktion

Für die Extraktion von RNA des BVDV werden u. a. folgende Kitsysteme empfohlen:

QIAamp® Viral RNA Mini (QIAGEN)	Plasma, Serum, EDTA-Blut, Milch
QIAamp® MinElute® Virus Spin (QIAGEN)	Plasma, Serum, EDTA-Blut
NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel)	Plasma, Serum, EDTA-Blut
MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit (AM 1836, Applied Biosystems)	Plasma, Serum
RNeasy Mini Kit (QIAGEN), user-developed protocol	Milch
RNeasy® Fibrous Tissue Mini (QIAGEN)	Ohrgewebe

Falls die real-time RT-PCR nicht sofort im Anschluss an die RNA-Extraktion durchgeführt wird, sind die RNA-Isolate bei -20 °C oder besser bei -70 °C zu lagern.

Zur schnellen Präparation von Ohrgewebeproben (Stanzproben von \varnothing 2-3 mm) ohne RNA-Extraktion wird VIROTYPE® TLR empfohlen. Die Lyseansätze können bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder bis zu 12 h bei $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

BVDV real-time RT-PCR Protokoll

Bitte lesen Sie das gesamte Protokoll, bevor Sie mit der Testdurchführung beginnen. Da RNA-Moleküle sehr instabil sind, wird eine zügige Arbeitsweise empfohlen. Der Enzym-Mix sollte erst kurz vor Gebrauch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ entnommen, immer auf Eis gelagert und nach Gebrauch sofort wieder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

1. Reagenzien vor der Verwendung kurz anzentrifugieren, Pipettierschritte auf Eis ausführen.
2. Master-Mix durch Mischen von PCR-Mix (gelbe Verschlusskappe) und Enzym-Mix (grüne Verschlusskappe) herstellen:

Anzahl der Reaktionen	1	25	96	480
PCR-Mix	19,75 μl	493,75 μl	1.896,00 μl	9.480,00 μl
Enzym-Mix	0,25 μl	6,25 μl	24,00 μl	120,00 μl
Σ Master-Mix Volumen	20,00 μl	500,00 μl	1.920,00 μl	9.600,00 μl

Planen Sie den Master-Mix für die Anzahl der durchzuführenden Reaktionen (Anzahl der Proben + Kontrollen) zzgl. einer Reserve. In jedem Lauf sollten mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden. PCR-Mix und Enzym-Mix in ein steriles Reaktionsgefäß pipettieren und mischen, anzentrifugieren.

3. 20 μl des Master-Mixes pro Reaktionsansatz in jeweils eine Kavität einer optischen Mikrotiterplatte bzw. in optische Reaktionsröhrchen übertragen.
4. 5 μl der RNA-Probe bzw. der Kontrollen (rot bzw. blau) zupipettieren und mischen. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes beträgt somit 25 μl . Die Reaktionskavitäten sofort mit optischer Abdeckfolie oder Deckel verschließen, ggf. anzentrifugieren.

In der Geräte-Software bitte folgende Einstellungen für Reporter und Quencher verwenden:

	Reporter	Quencher
BVDV	FAM	TAMRA
Interne Kontrolle	HEX/JOE*	TAMRA
Passive Referenz	ROX	

*abhängig von der möglichen Einstellung am jeweiligen Gerät

Real-time RT-PCR-Programm:

50 °C	20 min	
95 °C	15 min	
95 °C	30 s	40 Zyklen
57 °C	45 s	Messung am Ende dieses Schrittes
68 °C	45 s	

Testvalidierung

Für eine gültige Messung sollen das FAM-Signal und das HEX-Signal der Positivkontrolle¹ einen Ct-Wert² kleiner als 36 ergeben ($Ct < 36$). Die Negativkontrolle sollte kein FAM-Signal, aber ein HEX-Signal von $Ct < 36$ aufweisen.

1 2×10^3 RNA-Kopien/ μ l

2 Threshold cycle (Ct): Zyklus, bei dem die Amplifikationskurve den Detektionsschwellenwert schneidet, d. h. wo die erste deutliche Zunahme an Fluoreszenz detektiert wird.

Interpretation der Ergebnisse

A. Ein FAM-Fluoreszenzsignal wird detektiert:

→ **Das Ergebnis ist positiv, die Probe enthält BVDV.**

Die Detektion eines HEX-Fluoreszenzsignales ist in diesem Falle nicht zwingend notwendig, da sehr hohe Ausgangskonzentrationen an BVDV-RNA durch Konkurrenz zu einem reduzierten bzw. ausbleibenden Signal für die interne Kontrolle führen können. Liegt der erhaltene Ct-Wert für das FAM-Fluoreszenzsignal einer Einzelprobe in einem Bereich kleiner als Ct 30 ($Ct < 30$), so handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein persistent infiziertes Tier (PI-Tier).

B. Es wird kein FAM-Fluoreszenzsignal, jedoch ein HEX-Fluoreszenzsignal (interne Kontrolle) detektiert:

→ Das Ergebnis ist negativ, die Probe enthält kein BVDV.

Die Detektion des HEX-Fluoreszenzsignales für die interne Kontrolle schließt die Möglichkeit einer vollständigen PCR-Inhibition aus.

C. Weder ein FAM-Fluoreszenzsignal noch ein HEX-Fluoreszenzsignal werden detektiert:

→ Der Test ist ungültig, eine diagnostische Aussage ist nicht möglich.

Es erfolgte eine PCR-Inhibition. Es wird empfohlen, die jeweiligen Einzelproben verdünnt (z. B. 1:5) in Nuklease-freiem Wasser nachzutesten oder die RNA-Extraktion aus der Probe zu wiederholen bzw. den Test mit frischem Probenmaterial zu wiederholen.

Notizen.....