



# VIROTYPE<sup>®</sup> BTV Plus

## Gebrauchsinformation

Real-time Multiplex RT-PCR Testkit zum Nachweis des Bluetongue-Virus und des BTV-Serotyps 8

### *in vitro*-Diagnostikum für Wiederkäuer

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17c TierSG zugelassen.

Zulassungs-Nr.: FLI-B 539

VIROTYPE <sup>®</sup> BTV Plus	25 Reaktionen	Artikelnummer	05-106/25
VIROTYPE <sup>®</sup> BTV Plus	96 Reaktionen	Artikelnummer	05-106/96
VIROTYPE <sup>®</sup> BTV Plus	480 Reaktionen	Artikelnummer	05-106/480

### Verwendungszweck

Die Produktgruppe VIROTYPE<sup>®</sup> umfasst Testsysteme zum Nachweis von pathogenen Viren mittels real-time PCR. VIROTYPE<sup>®</sup> BTV Plus ermöglicht den Nachweis des Erregers der Blauzungenkrankheit mittels real-time Multiplex RT-PCR in Vollblut (Einzel- oder Poolproben) und Gewebeproben (Milz, Lymphknoten) von Wiederkäuern. Mit dem Testkit werden alle bekannten Serotypen des Bluetongue-Virus (BTV), der europäische BTV-Serotyp 8 (BTV-8) und eine Amplifikations- und Extraktionskontrolle nachgewiesen.

### *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 Blauzungkrankheit (Bluetongue Disease) ist eine nicht ansteckende Infektionskrankheit von Wiederkäuern. Der Erreger ist das Bluetongue-Virus (BTV), ein doppelsträngiges RNA-Virus der Gattung *Orbivirus* aus der Familie *Reoviridae*, das in mind. 24 Serotypen vorkommt. Das Virus ist weltweit verbreitet. Von der Krankheit sind vor allem Schafe, Rinder und Ziegen betroffen. Schafe zeigen in der Regel deutlichere Symptome. In schweren Fällen kann es zu einer Schwellung und Blaufärbung der Zunge (Bluetongue) kommen.

Der BTV-Serotyp 8 ist in Mitteleuropa von besonderer epidemiologischer Bedeutung und für Ausbrüche der Blauzungkrankheit in jüngerer Zeit verantwortlich. Überträger der Tierseuche sind bestimmte Stechmücken der Gattung *Culicoides* (Gnitzen). Daneben kann das Virus auch über unsaubere Kanülen bei Behandlungen und Blutentnahmen verbreitet werden.

Durch seine hohe Sensitivität ermöglicht VIROTYPE® BTV Plus den sicheren und frühzeitigen Nachweis des Erregers sowohl in Blutproben (Einzel- und Poolproben bis zu einer Größe von 10 Einzelproben) als auch in Gewebeproben (Milz, Lymphknoten).

## Beschreibung des Testprinzips

VIROTYPE® BTV Plus enthält alle Reagenzien zum Nachweis von BTV-RNA sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle.

Die Reverse Transkription (RT) der 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).

VIROTYPE® BTV Plus verwendet jeweils eine Primer-Sonden-Kombination spezifisch für die RNA aller bekannten BTV-Serotypen (FAM-Fluoreszenz), für die BTV-8-RNA (Cy5-Fluoreszenz) sowie für die Kontroll-RNA (interne Kontrolle, HEX-Fluoreszenz). Als interne Kontrolle des Tests wird mRNA des  $\beta$ -Actin Housekeeping Gens amplifiziert, die in jeder Blut- und Gewebeprobe enthalten ist. Damit ist eine Kontrolle sowohl der Extraktion als auch der Amplifikation gewährleistet.

Die Positivkontrolle enthält BTV-8-RNA und dient auch als Kontrolle des Denaturierungsschrittes, da nur bei erfolgreicher Denaturierung der viralen, doppelsträngigen RNA eine erfolgreiche Amplifizierung durchgeführt werden kann.

Inhalt		25 Reaktionen	96 Reaktionen	480 Reaktionen
1	<b>BTV Plus-Mix</b> (orange Verschlusskappe) inkl. Primer, Sonden und Enzyme	520 µl	2 x 980 µl	6 x 1,625 ml
2	<b>Positivkontrolle</b> (rote Verschlusskappe)	25 µl	70 µl	2 x 50 µl
3	<b>Negativkontrolle</b> (blaue Verschlusskappe)	25 µl	70 µl	2 x 50 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.

**BTV Plus-Mix und Positivkontrolle dürfen nicht häufiger als dreimal aufgetaut werden und sollten vor noch häufigerem Gebrauch aliquotiert werden.**

## Zusätzlich benötigte Materialien

- RNA-Extraktionskit
- Pipetten (0,5 µl – 1000 µl)
- Sterile, Aerosol-resistente Filterspitzen
- Sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße
- PCR-Thermocycler oder Heizblock
- Eisbad oder flüssigen Stickstoff
- Tischzentrifuge
- PCR-Gefäße: Reaktionsplatte, 96 Kavitäten bzw. Reaktionsröhrchen
- Optische Abdeckfolie oder entsprechende Deckel
- Real-time PCR Gerät: z. B. Mx3000P, Mx3005P (Stratagene/ Agilent), ABI PRISM® 7000, 7500 SDS (Applied Biosystems), CFX96 System (BioRad) oder 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.

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® BTV Plus ist geeignet zum Nachweis von BTV-RNA aus Vollblut (bevorzugt gerinnungsgehemmt, z. B. EDTA-Blut) und Gewebeproben (Milz, Lymphknoten) von Wiederkäuern. Auf Grund der hohen Sensitivität des Testkits können Blutproben in Pools aus bis zu 10 Einzelproben getestet werden. Die optimale Poolgröße hängt jedoch von der BTV-Prävalenz im untersuchten Gebiet ab.

## RNA-Extraktion

Für die Extraktion von BTV-RNA können u. a. folgende Kitsysteme verwendet werden:

QIAamp® Viral RNA Mini (QIAGEN)	EDTA-Blut
High Pure Viral RNA Kit (Roche)	EDTA-Blut
Invisorb Spin Virus RNA Mini Kit (Invitex)	EDTA-Blut, Gewebeproben
RNeasy® Kit (QIAGEN)	Gewebeproben
RNeasy® Fibrous Tissue Kit (QIAGEN)	Gewebeproben
NucleoSpin® RNA II (Machery & Nagel)	Gewebeproben
oder vergleichbare, validierte Systeme	

**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.**

## BTV Plus 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.

Alle Reagenzien vor der Verwendung bei Raumtemperatur (18-25 °C) lichtgeschützt auftauen lassen, mischen und kurz anzentrifugieren; Pipettierschritte auf Eis ausführen.

Planen Sie die Anzahl der durchzuführenden Reaktionen (Anzahl der Proben + Kontrollen) zzgl. einer Reserve. In jedem Lauf sollte eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

1. Den BTV Plus-Mix (orange Verschlusskappe) mischen, kurz anzentrifugieren, die benötigte Gesamtmenge entnehmen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführen.

**Den nicht benötigten BTV Plus-Mix sofort wieder bei -20 °C im Dunkeln lagern.**

2. **Denaturierung der doppelsträngigen BTV-RNA**
  - a Überführen von 5 µl RNA-Probe bzw. Kontrollen (rote bzw. blaue Verschlusskappe) in 0,2 ml PCR-Gefäße
  - b Reversibles Verschließen der PCR-Gefäße (z. B. adhäsive PCR-Folien)
  - c Hitzedenaturierung für 5 min bei 98 °C in einem PCR-Thermocycler oder Heizblock
  - d sofortiges Abkühlen in Eiswasser oder flüssigem Stickstoff für mind. 20 sec
  - e Überführung in ein gekühltes PCR-Rack (-20 °C) oder auf Eis lagern
3. 20 µl BTV Plus-Mix zu den Proben bzw. Kontrollen in den jeweiligen PCR-Gefäßen pipettieren.  
Das Gesamtvolumen eines Ansatzes beträgt somit 25 µl.
4. Verschließen der PCR-Gefäße mit optischer Abdeckfolie oder Deckel, ggf. anzentrifugieren.

### **Zu beachten!**

**Für die Denaturierung der RNA-Proben sind geeignete, dünnwandige Reaktionsgefäße oder PCR-Platten zu verwenden. Anschließend muss sofort die Abkühlung durchgeführt und die Ansätze bis zum RT-PCR-Start gekühlt gelagert werden, um ein Renaturieren der Einzelstrang-RNA zu verhindern.**

In der Geräte-Software bitte folgende Filter-Einstellungen verwenden:

	Reporterfarbstoff
<b>BTV</b>	<b>FAM</b>
<b>BTV-8</b>	<b>Cy5</b>
<b>Interne Kontrolle</b>	<b>HEX/JOE/VIC<sup>1</sup></b>
<b>Passive Referenz<sup>2</sup></b>	<b>ROX</b>

1 abhängig von der möglichen Einstellung am jeweiligen Gerät

2 interne Referenz bei Verwendung von ABI PRISM<sup>®</sup> Sequence Detection Systems

## BTV Plus Real-time RT-PCR-Programm:

50 °C	10 min	
95 °C	10 min	
95 °C	15 sec	40 Zyklen
60 °C	60 sec	Messung am Ende dieses Schrittes

(Gesamtdauer mit Stratagene Mx3000P: 1 h 47 min)

Alternativ können bei Verwendung des **VIROTYPE<sup>®</sup>-Programms** gleichzeitig Testungen weiterer VIROTYPE<sup>®</sup> Produkte (VIROTYPE<sup>®</sup> BVDV, VIROTYPE<sup>®</sup> CSFV und VIROTYPE<sup>®</sup> Influenza A) in einem Gerät durchgeführt werden:

## VIROTYPE<sup>®</sup> 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	

(Gesamtdauer mit Stratagene Mx3000P: 2 h 29 min)

## Testvalidierung

Für eine gültige Messung sollen das FAM-, das Cy5- und das HEX-Signal der Positivkontrolle einen Ct-Wert von kleiner als 35 ( $Ct < 35$ ) ergeben. Werden weder ein FAM- noch ein Cy5-Signal für die Positivkontrolle detektiert, so kann der Denaturierungsschritt und die anschließende Abkühlung der Positivkontrolle und der Proben unzureichend gewesen sein. In diesem Fall muss die Testung mit neuen Proben wiederholt werden.

Die Negativkontrolle weist kein FAM-, kein Cy5- und kein HEX-Signal auf.

## Interpretation der Ergebnisse

### A Ein FAM- und ein Cy5-Fluoreszenzsignal werden detektiert:

→ Das Ergebnis ist positiv.

**Die Probe enthält BTV-RNA (FAM) und BTV-8-RNA (Cy5).**

Die Detektion eines HEX-Fluoreszenzsignales ist in diesem Falle nicht zwingend notwendig, da sehr hohe Ausgangskonzentrationen an BTV-RNA durch Konkurrenz zu einem reduzierten bzw. ausbleibenden Signal für die interne Kontrolle führen können.

### B Ein FAM-, jedoch kein Cy5-Fluoreszenzsignal wird detektiert:

→ Das Ergebnis ist positiv.

**Die Probe enthält BTV-RNA (FAM), aber keine BTV-8-RNA (Cy5).**

Die Detektion eines HEX-Fluoreszenzsignales ist in diesem Falle nicht zwingend notwendig, da sehr hohe Ausgangskonzentrationen an BTV-RNA durch Konkurrenz zu einem reduzierten bzw. ausbleibenden Signal für die interne Kontrolle führen können.

### C Es wird nur ein HEX-Fluoreszenzsignal (interne Kontrolle) detektiert:

→ Das Ergebnis ist negativ. Die Probe enthält keine BTV-RNA.

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

**D Es wird kein Fluoreszenzsignal detektiert:**

**→ Der Test ist ungültig. Eine diagnostische Aussage ist nicht möglich.**

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

**Notizen.....**