

GEBRAUCHSINFORMATION



ingenetix GmbH

Arsenalstraße 11, 1030 Wien, Austria, T +43(0)1 36 198 0 198,
F +43(0)1 36 198 0 199, office@ingenetix.com, www.ingenetix.com

ViroReal[®] Kit BVD Virus

REF DVEV00613 Σ 100

REF DVEV00653 Σ 50



Wirksame Bestandteile

Box A

Beschriftung	Inhalt	Menge	
		DVEV00613	DVEV00653
BVDV Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonde (FAM) für BVD Virus Detektion	2 x 50 µl	1 x 50 µl
RNA IPC-3 Assay Mix (gelber Verschluss)	Primer und Sonde (Cy5) für RNA IPC Detektion	2 x 50 µl	1 x 50 µl
RNA IPC Target (oranger Verschluss)	RNA Interne Positivkontrolle	1 x 100 µl	1 x 100 µl
BVD Virus RNA Positiv Kontrolle (roter Verschluss)	RNA Positivkontrolle (ca. 25.000.000 Targetkopien/µl)	1 x 15 µl	1 x 15 µl

Box B

Beschriftung	Inhalt	Menge	
		DVEV00613	DVEV00653
RNA Reaktions Mix (weißer Verschluss)	RNA Reaktions Mix	2 x 250 µl	1 x 250 µl
Nuklease-freies Wasser (blauer Verschluss)	Nuklease-freies Wasser	2 x 1000 µl	1 x 1000 µl

In-vitro-Diagnostikum

1. Anwendungszweck

Das Anwendungsgebiet für ViroReal® Kit BVD Virus ist der spezifische Nachweis der Nukleinsäuren von BVD Viren (RNA des BVD Virus Typ BVDV-1, BVDV-2 und BVDV-3) extrahiert aus Serum oder Plasma von Rindern bzw. einzeln oder bis zu 25 gepoolte Ohrstanzen-Gewebeproben von Rindern unter Verwendung von reverser Transkription real-time PCR.

2. Arbeitsanweisung

2.1. Prinzip der real-time PCR

Bei der Detektion von Pathogenen mittels reverser Transkription real-time PCR wird ein spezifischer RNA-Bereich aus dem Erregergenom in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Das erzeugte PCR-Produkt wird mit Hilfe einer Oligonukleotid-Sonde detektiert, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Diese Technologie ermöglicht den sequenzspezifischen Nachweis von PCR Amplifikaten.

Der ViroReal® Kit BVD Virus wurde für ABI PRISM® 7500 Instrument (Applied Biosystems), LightCycler® 480 (Roche) und Mx3005P® (Agilent) entwickelt, eignet sich aber auch für andere real-time PCR Geräte.

2.2. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- In jedem PCR-Lauf muss immer eine Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser anstelle von Probe) mitgeführt werden.
- Optional: für eine zulässige Interpretation der Ergebnisse sollte eine Negativkontrolle während der RNA-Extraktion (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial) mit einbezogen werden, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kontamination mit BVDV RNA während der Extraktion ausschließen zu können.
- Beim Hantieren mit der Positivkontrolle ist Vorsicht geboten.
- Lagerung und Extraktion von positivem Material (Proben, Kontrollen und Amplifikate) sollte separat von allen anderen Reagenzien erfolgen, die Zugabe zum Reaktions Mix anschließend in einer räumlich getrennten Einheit.
- Labortische und Hilfsmittel müssen regelmäßig dekontaminiert werden.
- Verwendung von sterilen Filterpipettenspitzen ist erforderlich.
- Der RNA Reaktions Mix sollte immer auf Eis gehalten werden. Alle weiteren Komponenten müssen vor dem Ansetzen des Master Mixes vollständig bei Raumtemperatur auftauen. Nach dem Auftauen müssen die einzelnen Komponenten gemischt und kurz zentrifugiert werden.
- Die RNA soll sofort nach Extraktion verwendet und so bald als möglich auf -20°C bis -80°C gelagert werden.
- **Vorsicht:** die Positivkontrolle und das RNA IPC Target werden in RNA-Stabilizer aufbewahrt, der Guanidinthiocyanat/Triton X-100 enthält.

2.3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Reagenzien und Laborgeräte für RNA-Extraktion
- Nuklease-freies Wasser
- Puderfreie Laborhandschuhe
- Pipetten (einstellbar)
- Sterile Filterpipettenspitzen
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße

2.3.1. Für ABI PRISM® 7500 Fast Instrument (Applied Biosystems)

- Entweder: MicroAmp Fast Reaction Tubes (125 strips; 8 tubes/strip) (Bestell-Nr. 4358293) + MicroAmp Optical 8-Cap Strip (300 strips; 8 Tubes/Strip) (Bestell-Nr. 4323032)
- Oder: MicroAmp Fast Optical 96-well reaction plate with barcode (0.1 ml) (20 plates) (Bestell-Nr. 4346906) + MicroAmp Optical Adhesive Film (100 pieces) (Bestell-Nr. 4311971)
- 7500 Fast Precision Plate Holder for MicroAmp Tube Strips

2.3.2. Für ABI PRISM® 7500 Instrument (Applied Biosystems)

- Entweder: ABI PRISM™ Optical Tubes (8 Tubes/ Strip) (125 strips; 8 tubes/strip) (Bestell-Nr. 4316567) + MicroAmp Optical 8-Cap Strip (300 strips; 8 Tubes/Strip) (Bestell-Nr. 4323032)
- Oder: 96-Well Optical Reaction Plate with barcode (20 plates) (Bestell-Nr. 4306737) + Optical Adhesive Cover Starter Kit (20 pieces) (Bestell-Nr. 4313663)

2.3.3. Für Mx3005P® QPCR System (Agilent)

- Entweder: 96-well PCR plates, 0.2 ml, non-skirted (Bestell-Nr. 401333)
Oder: 8 x strip tubes, 0.2 ml (Bestell-Nr. 401428) und 8 x optical strip caps (Bestell-Nr. 401425)

2.3.4. Für LightCycler® 480 (Roche)

- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white with sealing foils (Bestell-Nr. 04729692001)

2.4. Vorbereitung der real-time PCR

Bitte beachten Sie, dass pro PCR-Lauf mindestens eine Negativkontrolle (10 µl Nuklease-freies Wasser, blauer Verschluss) als auch eine Positivkontrolle (BVD Virus RNA Positiv Kontrolle, roter Verschluss) und eine Extraktions-Negativkontrolle (optional, empfohlen) mitgeführt werden.

Ingenetix empfiehlt die PCR Analysen im Doppelansatz durchzuführen, da dadurch die Wahrscheinlichkeit des Pathogen Nachweises erhöht und die Interpretation der Ergebnisse erleichtert wird.

RNA Interne Positivkontrolle:

Ein internes RNA Positivkontrollsystem, das den RNA IPC-3 Assay und das RNA IPC Target (eine *in vitro* synthetisierte RNA in RNA-Stabilizer) enthält, schließt die Interpretation falsch-negativer Resultate aufgrund Inhibierung der reversen Transkription real-time PCR aus.

→ Dazu wird das RNA IPC Target frisch 1:500 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und zum Master Mix pipettiert (Verwendung von 1 µl/Reaktion).

→ Alternativ kann zur Kontrolle der RNA Extraktion und PCR Inhibierung das RNA IPC Target während der Extraktion zugegeben werden. Spiken Sie dafür 1 µl unverdünntes RNA IPC Target zur Probe nach Zugabe des Lysepuffers.

Achtung: Das RNA IPC Target darf nicht direkt zum Probenmaterial zugegeben werden.

Positivkontrolle:

Die BVD Virus RNA Positiv Kontrolle ist eine *in vitro* synthetisierte RNA in RNA-Stabilizer. Sie muss bei -20°C gelagert und vor Verwendung frisch 1:500 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt werden - entspricht ca. 50.000 Targetkopien/µl.

→ Für die Positivkontrolle wird 1 µl 1:500 frisch verdünnte BVD Virus RNA Positiv Kontrolle + 9 µl Nuklease-freies Wasser eingesetzt. Achtung: Der Einsatz von mehr als 1 µl Positivkontrolle (1:500 verdünnt) inhibiert die RT-PCR Reaktion.

Optional kann eine 1:10 Verdünnung der 1:500 verdünnten Positivkontrollen verwendet und als zweiter Standard (ca. 5.000 Targetkopien/µl) definiert werden.

- Master Mix möglichst auf Eis ansetzen.
- Den RNA Reaktions Mix auf Eis auftauen und 2 bis 3 Mal kippen, um eine homogene Lösung sicherzustellen. Den RNA Reaktions Mix nicht auf Raumtemperatur aufwärmen lassen.
- Die RNA soll unmittelbar nach der Extraktion verwendet und so bald als möglich auf -20°C bis -80°C gelagert werden.

2.5. Pipettierschema

		Pro Probe
Ansetzen des Master Mixes (gut durchmischen)	Nuklease-freies Wasser*	2,0 µl
	RNA Reaktions Mix	5,0 µl
	BVDV Assay Mix	1,0 µl
	RNA IPC-3 Assay Mix	1,0 µl
	RNA IPC Target# (frisch verdünnt 1:500)	1,0 µl
	Gesamtvolumen Master Mix	10,0 µl
Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	10,0 µl
	RNA-Probe*	10,0 µl
	Gesamtvolumen	20,0 µl

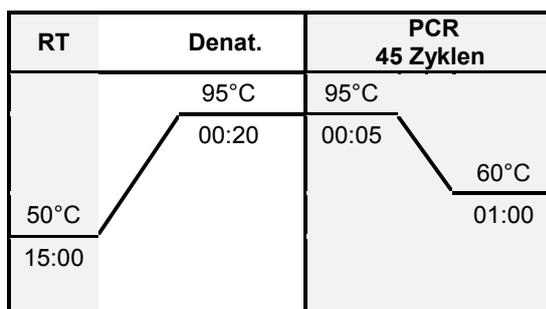
*Von der Probe können 1-10 µl eingesetzt werden. Bei einem Volumen von < 10 µl Probe muss das H₂O-Volumen entsprechend angepasst werden.

#Falls RNA IPC Target nicht bereits während der Extraktion zugegeben wurde.

2.6. Programmierung des Temperaturprofils

Informationen zur Programmierung Ihres real-time PCR Instruments finden Sie im jeweiligen Benutzerhandbuch des Herstellers.

- **Probenvolumen:** 20 µl
- **Temperaturprofil:**



Anmerkung: Diese Geräteparameter können für alle ViroReal®, BactoReal® and ParoReal Kits (ingenetix) auf allen PCR Instrumenten verwendet werden.

2.6.1. ABI PRISM® 7500 (Fast) Instrument

Geräteparameter für **Absolute Quantifizierung:**

- **Thermal Cycler - Bedingungen (für ABI Real-Time PCR Systeme):** ohne "fast cycling" Parameter
- **Detektoren:** FAM-TAMRA (530 nm) für Nachweis von BVDV
Cy5-NONE (667 nm) für Nachweis der RNA Internen Positivkontrolle
- **Passive Referenz:** ROX

2.6.2. Mx3005P® Instrument

• **Geräteparameter für Quantitative PCR:**

Aufnahme der Fluoreszenzdaten

- **Auswahl der Farbstoffe:** ROX, FAM und CY5
- **Auswahl des Referenzfarbstoffes:** ROX
- **Filterverstärker-Einstellungen:** ROX x2, FAM x8, und CY5 x4

2.6.3. LightCycler® 480 Instrument

	Program name	Acquisition mode	Cycle	Analysis mode
1: Program	50°C, 15 min	none	1 cycle	None
2: Program	95°C, 20 sec	none	1 cycle	None
3: Program	95°C, 5 sec 60°C, 1 min	none single	45 cycles	Quantification
4: Program	40°C, 10 sec	none	1 cycle	None

Aufnahme-Modus: einzeln bei 60°C

Analyse-Modus: Quantifizierung

Detektions-Format:

Name: Dual Color Hydrolysis Probe

Integration time mode: Dynamic

Filter Kombinationen:

Active	Name	Melt factor	Quant factor	Max integration time
Yes	FAM (465-510)	1	10	2 second(s)
Yes	Cy 5 / Cy 5.5 (618-660)	1	10	2 second(s)

2.7. Interpretation der PCR-Daten

Beispiele für die Interpretation von positiven Reaktionen sind in den unten angeführten Abbildungen dargestellt.

Folgende Kriterien müssen für eine gültige Interpretation erfüllt sein:

	Ct/Cp (FAM Kanal) BVD Virus Target	Ct/Cp RNA IPC Target	Interpretation
Negativkontrolle	negativ	26-29	gültig
Positivkontrolle (frisch verdünnt 1:500), ca. 50.000 Kopien, 1 µl/PCR	23-25	26-29	gültig
Extraktions-Negativkontrolle (optional)	negativ	26-29	gültig
Negative Probe	negativ	26-29	gültig
Positive Probe	positiv	26-29/negativ	gültig

Analyse der PCR-Daten:

Für die Analyse von PCR-Ergebnissen, die mit dem ViroReal® Kit BVD Virus erhalten wurden, die Fluoreszenzdarstellungs-Optionen 530 nm (FAM-Kanal) für das BVD Virus Target und den Cy5 Kanal für das RNA IPC Target auswählen. Proben mit einem positiven Ct oder Cp-Wert im FAM-Kanal werden positiv gewertet. Bitte überprüfen Sie die Amplifikationskurven auch manuell.

Nach Abschluss der Analyse sind folgende Ergebnisse möglich:

1. Signal im FAM Kanal:

→ RNA des BVD Virus, CSFV oder BDV wurde amplifiziert. Die Probe muss „positiv“ interpretiert werden.

2. Kein Signal im FAM Kanal, jedoch Signal der RNA Internen Positivkontrolle (RNA IPC Target):

→ In der Probe ist keine RNA des BVD Virus nachweisbar. Die Probe muss “negativ” interpretiert werden. Das positive Signal des RNA Internen Positivkontrolle Assays schließt eine mögliche PCR-Inhibierung aus.

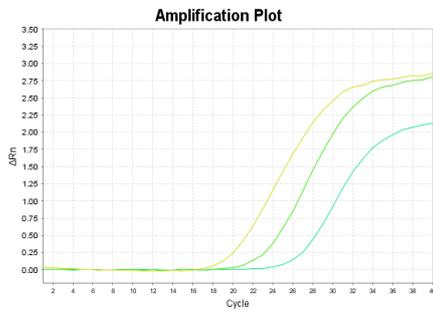
3. Kein Signal im Cy5 Kanal:

→ Es kann keine Aussage gemacht werden.

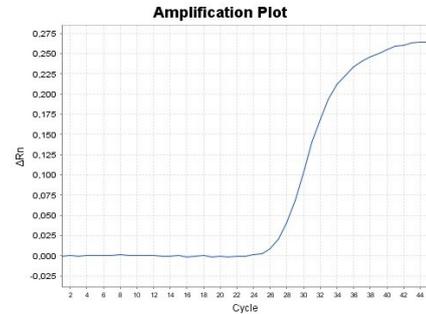
Hinweise bezüglich möglicher Fehlerquellen und deren Beseitigung sind unter Punkt 2.8. Troubleshooting angeführt.

Nachweis des
BVD Virus

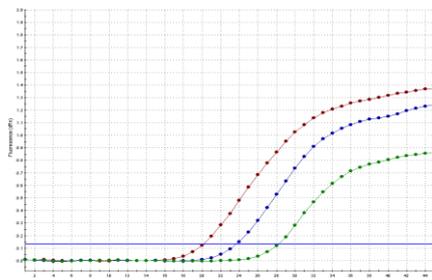
Nachweis der
RNA Internen Positivkontrolle



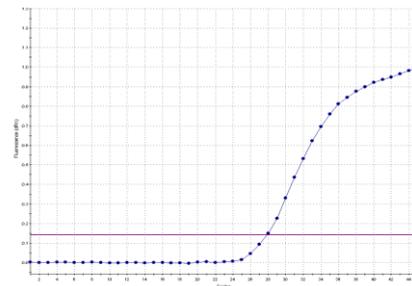
ABI Prism® 7500: FAM Kanal, 530 nm
1:10 serielle Verdünnung der BVDV RNA



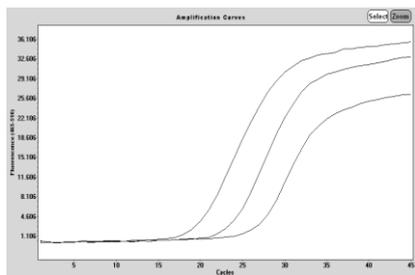
ABI Prism® 7500: Cy5 Kanal, 667 nm
Nachweis der RNA Internen Positivkontrolle



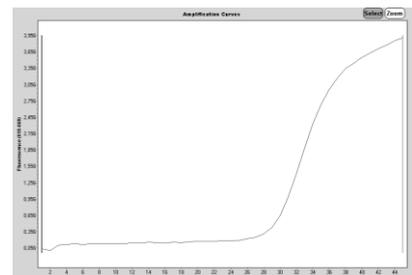
Mx3005P®: FAM Kanal
1:10 serielle Verdünnung von BVDV RNA



Mx3005P®: CY5 Kanal
Nachweis der RNA Internen Positivkontrolle



LightCycler® 480: FAM Kanal
1:10 serielle Verdünnung von BVDV RNA



LightCycler® 480: Cy5 Kanal
Nachweis der RNA Internen Positivkontrolle

2.8. Troubleshooting

2.8.1. Kein BVD Virus-spezifisches Signal mit der Positivkontrolle:

- Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils am real-time PCR Instrument.
→ Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Angaben im Protokoll (siehe Punkt 2.4. Vorbereitung der real-time PCR).
- Fehler in der Zusammensetzung der PCR-Reaktion.
→ Überprüfen Sie die Pipettierschritte an Hand des Schemas (siehe Punkt 2.4. Vorbereitung der real-time PCR) und, falls nötig, wiederholen Sie die PCR.
- Die RNA ist möglicherweise abgebaut.
→ Stellen Sie eine frische 1:500 Verdünnung der Positivkontrolle her und wiederholen Sie die PCR.

2.8.2. BVD virus-spezifisches Signal mit der Negativkontrolle:

- Es kam zu einer Kontamination während des Ansetzens der PCR.
→ Wiederholen Sie die PCR in Mehrfachansätzen mit neuen Reagenzien.
→ Pipettieren Sie die Positivkontrollen immer zuletzt.
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

2.8.3. BVD virus-spezifisches Signal mit der Negativkontrolle der RNA-Extraktion (optional):

- Während der Extraktion kam es zu einer Kontamination.
→ Wiederholen Sie die RNA-Extraktion und PCR mit neuen Reagenzien.
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

2.9. Spezifikationen

ViroReal® Kit BVD Virus wurde am ABI PRISM® 7500 (Fast) Instrument (Applied Biosystems), am LightCycler® 480 (Roche) und Mx3005P® (Agilent) validiert.

2.9.1. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität liegt bei 4 Kopien pro Reaktion.

2.9.2. Analytische Spezifität

Die Spezifität wird aufgrund der Wahl hochspezifischer Primer und Sonden gewährleistet. Durch Sequenzvergleich wurden Primer und Sonden auf mögliche Homologien mit den derzeit publizierten Sequenzen überprüft. Dadurch wurde auch der Nachweis bis jetzt bekannter BVD Virus Stämme validiert.

ViroReal® Kit BVD Virus detektiert alle BVDV-1, BVDV-2 und BVDV-3 Isolate, die bislang in der NCBI Datenbank publiziert wurden. Zudem reagiert er mit einigen Stämmen des Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) und des Border-Disease-Virus der Schafe (BDV). ViroReal® Kit BVD Virus wurde an 184 BVDV Serologie-positiven und 150 BVDV Serologie-negativen Proben getestet. PCR Resultate korrelierten mit jenen der Serologie.

3. Art der Aufbewahrung

Die Lagerung der Komponenten des ViroReal® Kit BVD Virus soll lichtgeschützt bei -20°C (± 5°C) erfolgen.

4. Datum des Verfalls

Die Komponenten des ViroReal® Kit BVD Virus sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Ablaufdatum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden.

5. Tierarten, für die das Mittel bestimmt ist

Der ViroReal® Kit BVD Virus ist ein In-vitro-Diagnostikum zum Nachweis von Nukleinsäuren von BVD Viren in Rindern.

6. Art und Beschaffenheit des Probenmaterials

Dieser Test erlaubt den raschen und sensitiven Nachweis von RNA des BVD Virus sowie auch von einigen Stämmen von CSFV und BDV aus Proben, die aus Serum und Plasma von Rindern bzw. einzeln oder bis zu 25 gepoolte Ohrstanzen-Gewebeproben von Rindern gereinigt wurden (z. B. mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen).

Anhang – Symbole



Hergestellt von



Bestell-Nummer



Ausreichend für "n" Ansätze



Verwendbar bis



Aufbewahrung bei

Erregerinformation

Die Gattung *Pestivirus* besteht aus 4 wichtigen Pathogenen: Bovines Virusdiarrhoe-Virus 1 und 2 (BVDV-1 und BVDV-2), Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) und Border-Disease-Virus der Schafe (BDV). Vor kurzem wurde eine neue, mutmaßliche Pestivirus Spezies, „HoBi-like“, „BVDV-3“ oder „atypisches Pestivirus“ genannt, entdeckt.

Das BVD Virus, ein Virus mit einem positivsträngigen RNA- Einzelstrang als Genom, ist weltweit endemisch und verursacht bovine Virusdiarrhöe (BVD). BVD ist eine Erkrankung des Rindes, die verschiedene klinische Symptome wie Diarrhoe, „Mucosal Disease“ (Schleimhautkrankheit), Funktionsstörungen bei der Fortpflanzung und/oder hämorrhagisches Syndrom, verursacht. Eine pränatale Infektion mit BVDV hat persistent infizierte (PI) Rinder (BVD-PI) zur Folge, welche das Virus lebenslang in sich tragen und eine große Anzahl viraler Partikel ausscheiden.

References:

Houe H, Lindberg A, Moennig V. 2006. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. J Vet Diagn Invest. 18:427-436.