

bactotype[®] Mastitis HP2+ PCR Kit

Gebrauchsinformation

Zum simultanen Nachweis der DNA von
Mycoplasma, *Mycoplasma bovis* und
Streptococcus agalactiae



96 Reaktionen (Katalog-Nr. BT280025)



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Leipzig, Deutschland

Inhalt

Kit-Inhalt.....	3
Verwendungszweck.....	3
Symbole.....	4
Qualitätskontrolle.....	4
Lagerung.....	5
Sicherheitshinweise.....	5
Einleitung.....	6
Testprinzip.....	7
DNA-Extraktion.....	8
Zusätzlich benötigte Materialien.....	9
Wichtige Hinweise.....	10
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen.....	10
Protokoll: Real-time PCR zum simultanen Nachweis Mastitis- verursachender Erreger.....	12
Wichtige Hinweise vor Beginn.....	12
Vorbereitungen.....	12
Durchführung.....	13
Auswertung.....	15
Interpretation der Ergebnisse.....	15
Änderungsindex.....	19

Kit-Inhalt

bactotype Mastitis HP2+ PCR Kit	(96)
Katalog-Nr.	BT280025
Anzahl der Reaktionen	96

Master Mix (Master-Mix, orangefarbener Deckel), enthält Enzyme, Primer und Sonden	2 x 980 µl
Positive Control (Positivkontrolle, roter Deckel)	1 x 150 µl
Negative Control (Negativkontrolle, blauer Deckel)	1 x 150 µl
Gebrauchsinformation	1

Verwendungszweck

bactotype Mastitis HP2+ PCR Kit ermöglicht den simultanen Nachweis der DNA von *Mycoplasma*, *Mycoplasma bovis* und *Streptococcus agalactiae* aus Milchproben (Viertelgemelksproben, gepoolten Proben sowie Tankmilch) von Wiederkäuern.

Nur für den tierärztlichen Gebrauch.

Symbole



Legaler Hersteller



Chargennummer



Zur Verwendung bis



Zulässiger Temperaturbereich für die Lagerung



Gebrauchsinformation



Katalognummer



Materialnummer



Vor Licht schützen



Für Proben von Wiederkäuern

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von INDICAL wird jede Charge des Tests bactotype Mastitis HP2+ PCR Kits nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Lagerung

Die Komponenten des bactotype Mastitis HP2+ PCR Kits sind bei -30°C bis -15°C zu lagern – unter diesen Lagerbedingungen sind sie mindestens bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 2x), da dadurch die Sensitivität des Assays verringert werden kann. Falls die Komponenten nur gelegentlich verwendet werden, frieren Sie sie aufgeteilt in Aliquots ein.

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen (safety data sheets, SDS). Diese erhalten sie von Ihrem lokalen Vertriebsmanager oder per Email von **compliance@indical.com**.

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

Einleitung

Der bactotype Mastitis HP2+ PCR Kit ist ein hochempfindlicher und spezifischer Test zum Nachweis der DNA von *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) und weiteren Mastitis-verursachenden Mycoplasma, sowie von *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) aus Milchproben (Viertelgemelksproben, gepoolten Proben sowie Tankmilch) von Wiederkäuern.

Die Mastitis der Rinder ist die teuerste Erkrankung bei Milchvieh weltweit, verursacht vor allem durch intramammäre Infektionen. Erkrankungen können sowohl mit erhöhter Zellzahl somatischer Zellen in der Kuhmilch als auch einer Verringerung der Milchleistung und Milchqualität einhergehen.

Die Mastitis kann klinisch oder subklinisch auftreten. Klinische Mastitis kann weiterhin in geringgradig klinisch, mittel- bis hochgradig klinisch und auch chronische Mastitis unterteilt werden und macht oftmals eine Antibiotika-Therapie erforderlich.

Eine große Anzahl verschiedener Bakterien können Mastitis verursachen. Diese können in Kuh-assoziierte (kontagiöse) Erreger (z.B. *S. agalactiae*, *M. bovis*, *S. aureus*) und Umweltkeime (z.B. *S. uberis*, *E. coli*, *Klebsiella*) unterteilt werden.

Der bactotype Mastitis HP2+ PCR Kit detektiert mit hoher Sensitivität die wichtigsten Kuh-assoziierten und hoch ansteckenden Bakterien *M. bovis*, *S. agalactiae* und weitere Mastitis-verursachende Mycoplasma.

Die folgenden Spezies von Mycoplasma werden vom bactotype Mastitis HP2+ PCR Kit detektiert:

- *M. alkalescens*
- *M. arginini*
- *M. bovigenitalium*
- *M. bovis*
- *M. californicum*
- *M. canadense*

Testprinzip

Beim Nachweis von Pathogenen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Bereiche aus dem Genom des Pathogens amplifiziert. Bei der real-time PCR wird das entstandene Amplifikat mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen detektiert. Diese sind in der Regel an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt, die spezifisch an das Amplifikat binden. Die Beobachtung des Verlaufs der Fluoreszenzintensität während der PCR (in Echtzeit, daher „real-time PCR“) ermöglicht den Nachweis des sich anreichernden Produkts, ohne die Reaktionsgefäße danach wieder öffnen zu müssen.

Der bactotype Mastitis HP2+ PCR Kit enthält alle Reagenzien, die für den simultanen Nachweis der DNA von Mycoplasma, *M. bovis* und *S. agalactiae* notwendig sind, einschließlich Positiv- und Negativkontrolle.

Eine interne Kontrolle schließt die Möglichkeit von falsch-negativen Resultaten aus.

Im Kit werden vier verschiedene Primer-Sonden-Kombinationen verwendet:

- FAM™-Fluoreszenz für DNA von *Mycoplasma*
- Cy[®]5- Fluoreszenz für DNA von *M. bovis*
- JOE™-Fluoreszenz für DNA von *S. agalactiae*
- Texas Red[®]-Fluoreszenz für die Interne Kontrolle (β -aktin DNA aus der Probe)

Mit der Positivkontrolle wird die Funktionalität des Pathogentests nachgewiesen, also zum Beispiel das korrekte Ansetzen des Reaktionsgemisches.

DNA-Extraktion

Der bactotype Mastitis HP2+ PCR Kit kann zum simultanen Nachweis der Erreger-DNA aus Milchproben von Wiederkäuern verwendet werden. Aufgrund der hohen Sensitivität des Tests können Viertelgemelksproben, gepoolte Milchproben sowie Tankmilchproben getestet werden.

Vor Durchführung der real-time PCR muss die DNA aus dem Ausgangsmaterial extrahiert werden. INDICAL bietet eine Auswahl verschiedener Produkte zur DNA-Extraktion aus Milchproben an.

- DNeasy[®] Mastitis Mini Kit
- MagAttract[®] Mastitis Kit

Falls die real-time PCR nicht unmittelbar nach der Extraktion durchgeführt wird, lagern Sie die DNA bei -30°C bis -15°C.

Zusätzlich benötigte Materialien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (safety data sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

- Pipetten
- Nuklease-freie aerosolgeschützte Pipettenspitzen mit Filter
- Sterile 1,5 ml Eppendorf®-Reaktionsgefäße
- Nuklease-freie (RNase/DNase-frei) Verbrauchsmaterialien
- Kühlvorrichtung oder Eis
- Tischzentrifuge mit Rotor für 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Real-time Thermocycler mit geeigneten Fluoreszenzkanälen
- Geeignete Software für den gewählten Thermocycler
- Geeignete PCR-Streifen und Deckel oder optische 96-well Mikrotiterplatte mit optischer Verschlussfolie oder optischem Deckel für den gewählten Thermocycler

Wichtige Hinweise

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Nuklease-freie Pipettenspitzen mit Filter verwenden
- Positivmaterial (Proben, Positivkontrollen, sowie Amplifikate) separat von allen anderen Reagenzien lagern und verarbeiten und in einem räumlich getrennten Bereich zum Reaktionsgemisch hinzufügen
- Alle Komponenten vor Testbeginn auf Eis auftauen lassen.
- Nach dem Auftauen die Komponenten durch Umdrehen mischen und anschließend kurz anzentrifugieren.
- Die Komponenten des Testkits nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Proben und Kontrollen während des Ansetzens auf Eis oder in einem Kühlblock halten.

Negativkontrolle

Bei jedem PCR-Lauf sollte mindestens eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Hierdurch können etwaige Kontaminationen im Reaktionsansatz entdeckt werden.

Positivkontrolle

Bei PCR-Ansätzen mit unbekanntem Proben wird empfohlen, eine Positivkontrolle im PCR-Lauf mitzuführen, das heißt eine Probe, von der bekannt ist, dass sie die interessierende bakterielle DNA enthält. Mit einer Positivkontrolle wird die Funktionalität des Pathogentests

nachgewiesen, also zum Beispiel das korrekte Ansetzen des Reaktionsgemisches. Setzen Sie 5 µl der im bactotype Mastitis HP2+ PCR Kit mitgelieferten Positivkontrolle ein, um die erfolgreiche Amplifikation der Zielsequenz zu überprüfen.

Interne Kontrolle

Zusätzliche Prozesssicherheit und Benutzerfreundlichkeit wird durch den in Form eines weiteren Primer-Sonden-Satzes enthaltenen Internen Kontrollansatzes gewährleistet, mit dem ein in der Probe vorhandenes Housekeeping-Gen (β -aktin DNA) nachgewiesen wird. Damit ist eine Kontrolle sowohl der Extraktion als auch der Amplifikation möglich.

Protokoll: Real-time PCR zum simultanen Nachweis Mastitis-verursachender Erreger

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie bitte den Abschnitt "Wichtige Hinweise" auf Seite 10, bevor Sie mit der Durchführung beginnen.
- Führen Sie bei jedem PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle (Positive Control) und eine Negativkontrolle (Negative Control) mit.
- Lesen Sie das Protokoll vollständig durch, bevor Sie mit der Durchführung beginnen, und stellen Sie sicher, dass Sie mit der Bedienung des gewählten real-time Thermocyclers vertraut sind.
- Führen Sie das Protokoll ohne Unterbrechungen durch.

Vorbereitungen

- Alle Komponenten auf Eis auftauen lassen und vor Licht schützen.
- Während des Ansetzens der PCR die Reagenzien auf Eis halten.
- Die Reagenzien vor dem Gebrauch kurz anzentrifugieren.

Durchführung

1. 20 µl des Master-Mix in jedes Reaktionsgefäß pipettieren. Dann 5 µl der extrahierten DNA-Probe hinzugeben (Tabelle 1).

Führen Sie Positiv- und Negativkontrolle mit.

Positivkontrolle: Anstelle der DNA-Probe 5 µl der Positivkontrolle (Positive Control) einsetzen.

Negativkontrolle: Anstelle der DNA-Probe 5 µl der Negativkontrolle (Negative Control) einsetzen.

Tabelle 1. Ansetzen des Reaktionsgemisches

Komponente	Volumen
Master-Mix	20 µl
Probe	5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

2. Die Reaktionsgefäße mit den passenden Deckeln verschließen.
3. In der Software des Thermocyclers die Filter für die Reporter gemäß Tabelle 2 einstellen.

Hinweis: Bei Verwendung des Agilent Mx3005P Thermocyclers die voreingestellten Filter Gain Settings (Factory Defaults Filter Gain Settings) einstellen (Cy5 1x, ROX 1x, HEX/ JOE 1x, FAM 8x).

Tabelle 2. Filtereinstellungen für den Reporter

Pathogen/ interne Kontrolle	Reporter
Mycoplasma	FAM
<i>M. bovis</i>	Cy5
<i>S. agalactiae</i>	HEX/ JOE ¹
Interne Kontrolle	Texas Red/ ROX ²

¹ Verwenden Sie die für den gewählten Thermocycler geeignete Einstellung

² Bei Verwendung des Applied Biosystems 7500 und Agilent Mx3005P, nicht ROX als passive Referenz einstellen.

4. Das in Tabelle 3 gezeigte real-time PCR-Protokoll verwenden.

Tabelle 3. Real-time PCR Protokoll für bactotype Mastitis PCR Kits

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Aktivierung	95°C	5 min	1
2-Schritt-Cycling			
Denaturierung	95°C	10 s	40
Annealing/Extension*	57°C	30 s	

* Erfassung der Fluoreszenzdaten. PCR-Laufzeit ca. 65 min (Agilent Mx3005P)

Auswertung

Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind gültig, wenn:

- Die Positivkontrolle muss in allen vier Fluoreszenzkanälen (FAM, HEX/ JOE, Texas Red/ ROX und Cy5) einen C_T^1 -Wert kleiner als 35 ergeben ($C_T < 35$).
- Die Negativkontrolle darf in allen Kanälen kein Fluoreszenzsignal aufweisen.

Bei der Arbeit mit unbekanntem Proben sind die in der Tabelle 4, Seite 17, beschriebenen Ergebnisse möglich.

- Überprüfen Sie, ob in der Probe ein Signal für die interne Kontrolle im Texas Red/ ROX-Kanal detektiert wird. Ein positives Texas Red/ ROX-Signal zeigt, dass sowohl Extraktion als auch Amplifikation erfolgreich durchgeführt wurden, da das Housekeeping-Gen der Probe amplifiziert wurde.
- Die Probe ist negativ, wenn ein Signal nur im Texas Red/ ROX-Kanal detektiert wird.
- Falls in allen vier Kanälen (FAM, HEX/ JOE, Texas Red/ ROX und Cy5) kein Signal detektiert wird, ist das Ergebnis uneindeutig und die Testung ungültig. Das Ausbleiben eines Signals für die interne Kontrolle weist auf eine Inhibition der PCR und/oder andere Probleme, z.B. eine fehlerhafte Extraktion, hin.

Zur Prüfung, ob eine Inhibition vorliegt, empfehlen wir, die jeweiligen extrahierten DNA-Proben 1:5 in Nuklease-freiem Wasser zu

¹ C_T , Threshold cycle (Schwellenzyklus) – Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert überschreitet, ab dem also erstmals ein klarer Anstieg der Fluoreszenz detektierbar ist

verdünnen, die DNA-Extraktion bzw. den gesamten Test mit frischem Probenmaterial zu wiederholen.

Überprüfen Sie, ob bei der Positivkontrolle (Positive Control) in den Kanälen zum Nachweis von Erreger-DNA (FAM, HEX/ JOE und Cy5) Fluoreszenzsignale detektiert wurden. Das Ausbleiben der Signale der Positivkontrolle weist auf einen Fehler hin, beispielsweise fehlerhaftes Ansetzen des Reaktionsgemisches oder eine falsche Programmierung des PCR-Gerätes.

Interne Kontrolle

Der interne Kontrollansatz dient als Extraktions- und Amplifikationsnachweis und basiert auf dem Nachweis eines Housekeeping-Gens der Wiederkäuer. Amplifikation der internen Kontrolle bedeutet, dass die Extraktion der Nukleinsäure und Ziel-DNA aus der Milchprobe erfolgreich war.

Als zusätzliche Information kann der C_T -Wert der internen Kontrolle einen Hinweis auf die somatische Zellzahl einer Milchprobe geben. Ein niedriger C_T -Wert der internen Kontrolle ($C_T < 29$) kann auf eine hohe somatische Zellzahl in der Milchprobe hinweisen.

Ein niedriger C_T -Wert der internen Kontrolle ist bei gleichzeitiger Abwesenheit positiver Signale in den Kanälen der Erregernachweise FAM, HEX/ JOE und Cy5 möglich und ein potentieller Hinweis auf eine erhöhte somatische Zellzahl, verursacht durch andere Erreger als denen, die mit diesem Kit detektiert werden.

Tabelle 4. Tabelle zur Interpretation der Ergebnisse¹

FAM	HEX/ JOE	Cy5	Texas Red/ ROX	Ergebnis der Probe
	(Pathogen)		(IC)	Positiv für:
X			X	Mycoplasma (nicht <i>M. bovis</i>)
	X		X	<i>S. agalactiae</i>
X		X	X	Mycoplasma <u>und</u> <i>M. bovis</i> ²
X	X		X	Mycoplasma (nicht <i>M. bovis</i>) <u>und</u> <i>S. agalactiae</i>
X	X	X	X	Mycoplasma <u>und</u> <i>M. bovis</i> <u>und</u> <i>S. agalactiae</i> ²
			X	negativ
				uneindeutig

¹ Die Ergebnisse können entsprechend interpretiert werden, sofern Positiv- und Negativkontrolle die erwarteten Ergebnisse zeigen. Die Positivkontrolle muss ein Signal in allen Kanälen (FAM, HEX/ JOE, Texas Red/ ROX und Cy5) aufweisen. Die Negativkontrolle darf in allen Kanälen kein Signal zeigen. Eine vollständige Erklärung aller möglichen Ergebnisse der Proben finden Sie im Abschnitt "Auswertung" ab Seite 15.

² In Fällen, in denen der C_T-Wert im Mycoplasma-Kanal (FAM) ≥ 2 C_T-Werte niedriger als der C_T-Wert des *M. bovis*-Kanals (Cy5) ist, ist die getestete Milchprobe positiv für *M. bovis* und zusätzlich für weitere Mycoplasma-Spezies (*M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovigenitalium*, *M. californicum* und/oder *M. canadense*).

INDICAL bietet zum Nachweis von veterinärmedizinisch relevanten Pathogenen eine Auswahl verschiedener ELISA-Kits sowie real-time PCR und real-time RT-PCR Kits an.

Weitere Informationen zu den Produktgruppen bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype und virotype finden Sie im Internet unter **www.indical.com**.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie in der jeweiligen INDICAL Kit-Gebrauchsinformation.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarungen für den bactotype Mastitis HP2+ PCR Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt zur Verfügung gestellten Protokollen, dieser Gebrauchsinformation und mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. INDICAL gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der in mit dem Produkt zur Verfügung gestellten Protokollen, dieser Gebrauchsinformation sowie in zusätzlichen, unter www.indical.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von Anwendern für andere Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von INDICAL nicht vollständig getestet und optimiert. INDICAL gewährt auf diese Protokolle keine Garantie und übernimmt auch keine Garantie dafür, dass sie die Rechte Dritter nicht verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt INDICAL keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. INDICAL lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. INDICAL kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihm bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines seiner geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können im Internet unter www.indical.com nachgelesen werden.

Warenzeichen/Markennamen: bactotype®, cador®, cattletype®, flocktype®, pigtype®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); DNeasy®, MagAttract® (QIAGEN GmbH); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); Applied Biosystems® 7500 (Applied Biosystems); FAM™, HEX™, JOE™, ROX™ (Life Technologies Corporation); Cy®5 (GE Healthcare); Texas Red® (Molecular Probes, Inc.); Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH). Lizenzierte Sonden sind durch Integrated DNA Technologies, Inc. hergestellt. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die in dieser Gebrauchsinformation verwendeten Markennamen oder Warenzeichen ungeschützt sind, auch wenn sie nicht als Markenname oder Warenzeichen gekennzeichnet sind.

HB-2375-002 © 2018 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, alle Rechte vorbehalten.

Änderungsindex

Gebrauchsinformation	Version	Änderung
HB-2375-002	Juni 2018	INDICAL-Design

INDICAL
BIOSCIENCE

Ordering: www.indical.com/contact
Technical Support: support@indical.com
Website: www.indical.com