

virotype[®] BVDV 2.0 RT-PCR Kit Manual de uso

Para la detección de ARN del *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV)

Certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal,
n.º MA: FLI-C 112



100 reacciones (n.º de catálogo VT280385)



500 reacciones (n.º de catálogo VT280387)



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

Contenido

Contenido del kit.....	3
Uso previsto	3
Símbolos.....	4
Control de calidad	4
Almacenamiento.....	5
Información de seguridad	5
Introducción.....	6
Principio	7
Extracción del ARN.....	8
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario	10
Notas importantes	11
Precauciones generales	11
Protocolo: RT-PCR en tiempo real para detectar el ARN del <i>Bovine Virus Diarrhea Virus</i>	13
Cuestiones importantes antes de comenzar	13
Antes de comenzar	13
Procedimiento	14
Análisis e interpretación de los datos	16
Interpretación de los resultados.....	16
Índice de cambios	24

Contenido del kit

virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit	(100)	(500)
N.º de catálogo	VT280385	VT280387
Número de reacciones	100	500
Master Mix (mezcla maestra) (tubo con tapón naranja); incluye primers, sondas y enzimas	1 × 800 µl	5 × 800 µl
Positive Control (control positivo) (tubo con tapón rojo)	1 × 150 µl	2 × 150 µl
Negative Control (control negativo) (tubo con tapón azul)	1 × 150 µl	2 × 150 µl
Manual de uso	1	1

Uso previsto

El virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit está destinado a la detección del ARN del *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV) en muestras de sangre, plasma, suero, tejido, leche y tejido auricular (individuales o agrupadas) de ganado bovino.

Este kit está autorizado por el Friedrich-Loeffler-Institut y ha sido certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal (FLI-C 112) para su uso en Alemania en procedimientos de diagnóstico veterinario.

Para uso exclusivo en el ámbito veterinario.

Símbolos



Fabricante legal



Número de lote



Fecha de caducidad



Límites de temperatura para almacenamiento



Manual de uso



Número de catálogo



Número de material



Proteger de la luz



Para muestras de ganado bovino

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de INDICAL, cada lote del virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Almacenamiento

Los componentes del virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit deben almacenarse a una temperatura comprendida entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Evite repetir el ciclo de descongelación-congelación (>3 veces), ya que esta práctica reduce la sensibilidad del ensayo. Congele los componentes en alícuotas si solo van a utilizarse de forma intermitente.

Información de seguridad

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes. Puede solicitarlas a su representante de ventas local o por correo electrónico a **compliance@indical.com**.

Todos los residuos de muestras y los objetos que han estado en contacto con las mismas deben descontaminarse o eliminarse como material potencialmente infeccioso.

Introducción

El virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit es una solución sensible para la detección del ARN del *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV) en muestras de ganado bovino.

La diarrea vírica bovina/enfermedad de las mucosas (Bovine Viral Diarrhea/Mucosal Disease, BVD/MD) es una de las enfermedades infecciosas más importantes del ganado bovino en todo el mundo. El microorganismo causante, el *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV), es un virus de ARN monocatenario que pertenece al género *Pestivirus* y existe en dos especies distintas: *Pestivirus A* (BVDV-1) y *Pestivirus B* (BVDV-2). Es posible determinar más subtipos. Según su crecimiento en cultivo celular, las colonias aisladas del BVDV de ambas especies se clasifican en los dos biotipos: citopático (cp) y no citopático (ncp).

Dependiendo del estado inmunitario de los animales, las infecciones por el virus BVDV pueden provocar síntomas digestivos y respiratorios de diferente gravedad, así como problemas reproductivos. Estos se deben a una infección transplacentaria del feto, que da lugar a abortos, malformaciones congénitas y, en caso de infección antes de la suficiencia inmunitaria, a terneros con infección persistente (IP) o viremia persistente.

Los animales con IP solo surgen a través de la infección prenatal, mientras que las infecciones posnatales provocan una viremia transitoria, lo que ocasiona la producción de anticuerpos neutralizantes. La enfermedad de las mucosas se produce cuando los animales con viremia persistente son portadores de los virus de la BVD de ambos biotipos (BVDV cp y ncp).

Los animales con IP no identificados son responsables de la propagación del BVDV, ya que excretan grandes dosis del virus a lo largo de toda su vida. Por tanto, pueden infectar a hembras preñadas que, a su vez, paren a otros animales con IP. La principal vía de combatir con éxito la enfermedad es identificar prematuramente a estos animales con IP.

Principio

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma de un patógeno. En la PCR en tiempo real, el producto amplificado se identifica mediante marcadores de fluorescencia. Estos suelen estar ligados a sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente al producto amplificado. La supervisión de las intensidades de la fluorescencia durante la serie de PCR (es decir, en tiempo real) permite detectar el producto acumulado sin necesidad de volver a abrir los tubos de reacción posteriormente.

El virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit contiene todos los reactivos necesarios para la detección de ARN del BVDV, incluidos un Positive Control y un Negative Control. Con este kit, tanto la transcripción inversa como la PCR tienen lugar en un solo tubo de reacción, lo que reduce el riesgo de contaminación.

El kit contiene dos controles internos. El control endógeno (Endogenous Control, EC) detecta el gen de la β -actina presente dentro de la muestra y el control exógeno (Exogenous Control, IC) permite realizar pruebas para conseguir una extracción y amplificación con éxito al añadirlo al procedimiento de purificación de ARN.

Ambos sistemas de control interno excluyen la posibilidad de obtener resultados negativos falsos.

El kit utiliza tres combinaciones específicas de primer/sonda:

- Fluorescencia FAM™ para el ARN del BVDV
- Fluorescencia HEX™ para el control endógeno (Endogenous Control, EC)
- Fluorescencia Cy⁵ para el control interno exógeno (Exogenous Internal Control, IC)

Un Positive Control permite verificar la funcionalidad de la mezcla de reacción para la amplificación del ARN diana del BVDV.

Extracción del ARN

El virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit está destinado a la detección del ARN del BVDV en muestras de sangre, plasma, suero, tejido, leche y tejido auricular de ganado bovino.

Debido a la alta sensibilidad del kit de pruebas, se pueden analizar muestras individuales o agrupadas. Las agrupaciones pueden constar de hasta 25 muestras de tejido auricular o 50 muestras de sangre individuales (sangre, plasma, suero), o 50 muestras de leche. Es posible aumentar el tamaño de las agrupaciones a hasta 100 muestras individuales si se usa sangre o leche.

Nota: En caso de uso en Alemania, se aplican las especificaciones descritas en el “*Amtliche Methodensammlung*”.

Antes de realizar la RT-PCR en tiempo real, debe extraerse ARN vírico del material de partida.

Opcional: El ARN de control interno exógeno (intype IC-RNA, n.º de catálogo IC289970) debe añadirse al **tampón de lisis** antes del procedimiento de extracción. En la mayoría de los casos, es suficiente con 2 µl de intype IC-RNA por muestra, pero deben probarse en el sistema de extracción empleado.

Para la preparación rápida de muestras de tejido auricular (diámetro de 2-3 mm) sin aislamiento de ARN, se recomienda el uso del virotype Tissue Lysis Reagent. Los lisados de tejido auricular deben analizarse de inmediato y pueden almacenarse a 2-8 °C hasta 12 horas o a entre -20 y -80 °C.

INDICAL ofrece una amplia gama de kits validados diseñados para la extracción de ARN de muestras de animales.

Extracción basada en microesferas magnéticas:

- **IndiMag® Pathogen Kit** (SP947457)
- **IndiMag Pathogen Kit w/o plastics** (SP947257)
- **IndiMag Pathogen IM48 Cartridge** (SP947654P608, SP947654P224)
- **IndiMag Pathogen KF96 Cartridge** (SP947855P196)

Extracción basada en columnas de centrifugado:

- **IndiSpin® Pathogen Kit** (SP54104, SP54106)
- **IndiSpin QIAcube® HT Pathogen Kit** (SP54161)

Lysis rápida

- **virotype Tissue Lysis Reagent** (SP289992, SP289993)

Si la RT-PCR en tiempo real no se realiza inmediatamente después de la extracción, almacene el ARN a -20 °C o bien a -80°C para un almacenamiento más prolongado.

Para obtener más información sobre la extracción automatizada y manual del ARN del BVDV de diferentes tipos de muestras, consulte el manual de uso correspondiente o póngase en contacto con el servicio de asistencia de INDICAL a través de **support@indical.com**.

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- **Opcional** (no incluido en el kit): intype IC-RNA (n.º de catálogo IC289970, INDICAL BIOSCIENCE)
- Pipetas
- Puntas de pipeta exentas de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros
- Consumibles exentos de nucleasas (sin ribonucleasa/ desoxirribonucleasa). Debe prestarse especial atención para evitar la contaminación con nucleasas de todos los reactivos y consumibles utilizados para configurar la PCR a fin de realizar una identificación sensible de los ácidos nucleicos víricos
- Dispositivo para enfriamiento o hielo
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de 1,5 ml
- Termociclador en tiempo real con canales de fluorescencia adecuados
- Software adecuado para el termociclador en tiempo real elegido
- Tubos y tapones de tiras adecuados o microplaca óptica de 96 pocillos con película adhesiva óptica o tapa para el termociclador en tiempo real elegido

Notas importantes

Precauciones generales

El usuario debe proceder siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones:

- Utilice puntas de pipeta exentas de nucleasas con filtros.
- Almacene y extraiga los materiales positivos (muestras, controles positivos y amplicones) en procedimientos independientes con respecto al resto de reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en una sala separada físicamente.
- Descongele todos los componentes en hielo antes de iniciar un ensayo.
- Cuando se hayan descongelado, mezcle los componentes mediante inversión y centrifúgelos brevemente.
- No utilice los componentes del kit de prueba si están caducados.
- Conserve las muestras y los controles en hielo o en un bloque de enfriamiento durante la configuración de las reacciones.

Control negativo

Como mínimo debe incluirse una reacción de control negativo en cada serie de PCR, que contenga todos los componentes de la reacción, excepto la secuencia del patógeno. Esta acción permite evaluar la contaminación de la reacción.

Control positivo

Si el procedimiento de la PCR se realiza en muestras no conocidas, se recomienda efectuar una reacción de control positivo en la serie de PCR que

contenga una muestra con ARN vírico diana. Un control positivo permite demostrar la funcionalidad del ensayo del patógeno, p. ej., que la mezcla de reacción se ha configurado correctamente. Utilice 5 µl del Positive Control suministrado con el virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit para probar que la diana se ha amplificado correctamente.

Control de la extracción y la amplificación

Para una mayor seguridad y comodidad del proceso, se incluyen dos ensayos de control de extracción y amplificación en el kit de prueba.

Un control interno endógeno (Endogenous Control, EC) detecta el gen de la β -actina presente en la muestra, mientras que el control interno exógeno (Exogenous Internal Control, IC) detecta intype IC-RNA, que debe añadirse al tampón de lisis antes del procedimiento de extracción (aplicación opcional). El uso de ambos sistemas de control permite supervisar la extracción y la amplificación también en muestras que presentarían al menos una inhibición parcial debido a la calidad de la muestra. En los procedimientos de lisis rápida, no se requiere un control interno exógeno (IC-RNA).

Protocolo: RT-PCR en tiempo real para detectar el ARN del *Bovine Virus Diarrhea Virus*

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea el apartado “Notas importantes” en la página 11 antes de comenzar.
- Se recomienda encarecidamente utilizar el intype IC-RNA para supervisar la extracción y la amplificación, así como cualquier inhibición parcial. Añada el volumen correspondiente al tampón de lisis antes de la extracción.
- Incluya como mínimo un control positivo (Positive Control) y un control negativo (Negative Control) para cada serie de PCR.
- Antes de comenzar el procedimiento, lea detenidamente el protocolo y familiarícese con el funcionamiento del termociclador para PCR en tiempo real elegido.
- El ARN es inestable. Lleve a cabo el protocolo sin interrupción.

Antes de comenzar

- Descongele todos los reactivos en hielo y protéjalos de la luz.
- Antes de utilizarlos, centrifugue brevemente los reactivos.
- Conserve los reactivos en hielo o en un bloque de enfriamiento durante la configuración de la PCR.

Procedimiento

1. Antes de utilizarla, mezcle la Master Mix invirtiéndola 5 veces o hasta que se mezcle bien y, a continuación, centrifugue brevemente para recoger los líquidos.
2. Pipetee 8 μl de la Master Mix en cada tubo de reacción. Después, añada 5 μl de ARN de muestra (tabla 1).

Incluya reacciones de control positivo y negativo.

Positive Control: utilice 5 μl del control positivo (Positive Control) en lugar de ARN de muestra.

Negative Control: utilice 5 μl del control negativo (Negative Control) en vez de ARN de muestra.

Tabla 1. Preparación de la mezcla de reacción

Componente	Volumen
Master Mix	8 μl
Muestra	5 μl
Volumen total	13 μl

3. Cierre los tubos de reacción o selle la placa e invierta 5 veces o hasta que se mezclen bien. A continuación, centrifugue brevemente para recoger los líquidos.
4. Defina los filtros para los marcadores indicador en el software del termociclador de acuerdo con la tabla 2.

Tabla 2. Configuración de los filtros para el indicador

Patógeno/control interno	Indicador
BVDV	FAM
Control interno endógeno (Endogenous Internal Control, EC)	HEX/JOE™ ¹
Control interno exógeno (Exogenous Internal Control, IC)	Cy5
Referencia pasiva ²	ROX™ ²

1 Utilice la opción apropiada para su termociclador.

2 Referencia interna para su uso con los ABI PRISM® Sequence Detection Systems (Applied Biosystems®)

5. Ejecute el protocolo de RT-PCR en tiempo real según la tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de RT-PCR en tiempo real para BVDV 2.0

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Transcripción inversa	50 °C	10 min	1
Activación inicial	95 °C	2 min	1
Ciclado en 2 pasos			
Desnaturalización	95 °C	5 s	40
Hibridación/extensión*	60 °C	30 s	

* Recopilación de datos de fluorescencia, tiempo de análisis aproximado de 64 min (CFX96, Bio-Rad™)

Análisis e interpretación de los datos

Interpretación de los resultados

Para que el ensayo tenga validez, el Positive Control debe emitir una señal en los canales FAM, HEX y Cy5 con un $C_T^1 < 35$. El Negative Control no debe emitir señal.

Los resultados siguientes pueden obtenerse si se trabaja con muestras no conocidas. Los resultados posibles de las muestras también se resumen en la tabla 4, en la página 19.

Para que la muestra se considere positiva para el BVDV y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:

- La muestra emite una señal en el canal FAM (independientemente de cualquier señal en el canal HEX y/o Cy5).
- El Positive Control emite una señal en todos los canales.
- El Negative Control no emite ninguna señal en los canales FAM, HEX y Cy5.

Tenga en cuenta que unas concentraciones muy elevadas de ARN de BVDV en la muestra pueden reducir la señal de los controles internos (HEX para el EC, Cy5 para el IC) o incluso suprimirla debido a la competencia con los controles internos.

¹ Ciclo umbral (C_T): ciclo en que el gráfico de amplificación cruza el umbral, es decir, cuando aparece el primer aumento claramente detectable de la fluorescencia

Para que la muestra se considere negativa para BVDV y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:

- La muestra **no emite** ninguna señal en el canal FAM.
- Cuando se utiliza con intype IC-RNA: La muestra emite una señal en los canales HEX y Cy5.
- Cuando se utiliza sin intype IC-RNA: La muestra emite una señal en el canal HEX.
- El Positive Control emite una señal en todos los canales.
- El Negative Control no emite ninguna señal en los canales FAM, HEX y Cy5.

Para que los resultados de la muestra se consideren no concluyentes y el ensayo no sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:

- La muestra no emite ninguna señal en ninguno de los canales.

Si no se detecta ninguna señal, el resultado es no concluyente. La ausencia de señal para el control interno endógeno (Endogenous Internal Control, EC) y el control interno exógeno (Exogenous Internal Control, intype IC-RNA, IC, solo cuando se aplica) indica una inhibición marcada de la PCR u otro error, p. ej., durante la extracción.

Para realizar una comprobación de inhibición, recomendamos efectuar una dilución 1:5 del ARN de muestra en agua sin nucleasa, repetir el procedimiento de extracción del ARN, o repetir todo el procedimiento de prueba comenzando con nuevo material de muestra.

Compruebe que haya una señal de fluorescencia en los canales FAM, HEX y Cy5 para la reacción del control positivo (Positive Control). La ausencia de señal para el Positive Control indica que se ha producido un error, que podría deberse a una configuración incorrecta de la mezcla de reacción o a condiciones inadecuadas del ciclado.

Información adicional proporcionada por los sistemas de control interno endógeno y exógeno:

La **falta de señal de fluorescencia Cy5** (aplicable solo si se ha aplicado intype IC-RNA) puede deberse a la extracción insuficiente de la muestra, la inhibición de la PCR, la competencia con una marcada señal positiva del BVDV, o se producirá en los casos en los que no se haya añadido el intype IC-RNA al tampón de lisis antes de la extracción de la muestra. Los valores de C_T más altos en el canal Cy5 de una muestra en comparación con la mayoría de las muestras pueden indicar una inhibición parcial en la muestra.

La **falta de señal de fluorescencia HEX** en presencia de una señal en el canal Cy5 indica una deficiente calidad o cantidad de la muestra.

Tabla 4. Tabla de interpretación de resultados*

Resultado de la muestra	FAM (BVDV)	HEX (EC)	<i>Opcional:</i>		Interpretación
			Cy5 (IC-RNA)		
Positivo en el BVDV	X	X	X		Válido
Positivo en el BVDV	X	X			Válido (extracción sin intype IC-RNA)
Marcado positivo en el BVDV	X	(X)	(X)		Válido (sin señal de EC o IC debido a la competencia)
Negativo en el BVDV		X	X		Válido
Deficiente calidad de la muestra		X	X		Señal de EC débil debido a una deficiente calidad de la muestra; se recomienda analizar una muestra nueva
Inhibición parcial de la PCR		X	(X)		Valor de C _T nulo o débil para IC-RNA (se recomienda analizar una dilución 1:5 de la muestra)
No concluyente			(X)		No hay señal para EC e IC, posiblemente debido a un fallo durante la extracción o la PCR

* La interpretación de los resultados de las muestras puede determinarse siempre que se realicen reacciones de control positivo y negativo. El Positive Control debe emitir una señal en los canales FAM, HEX y Cy5. El Negative Control no debe emitir ninguna señal en ningún canal. Para obtener una explicación detallada de los resultados posibles de las muestras, consulte el apartado “Análisis e interpretación de los datos” en la página 16.

INDICAL ofrece una amplia gama de kits para ELISA así como kits para PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real para la detección de patógenos de animales.

Visite **www.indical.com** para obtener más información sobre productos afosa, bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype, Svanovir y virotype.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o el manual del usuario del kit de INDICAL correspondiente.

Notas

Notas

Notas

Acuerdo de licencia limitada para el virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. INDICAL no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual y los protocolos adicionales disponibles en www.indical.com. Algunos de estos protocolos adicionales los han proporcionado usuarios de INDICAL para usuarios de INDICAL. INDICAL no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, INDICAL no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, INDICAL no garantiza que este kit y/o su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. INDICAL niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas. INDICAL se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidos los costes procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.indical.com.

Marcas comerciales: afosa[®], bactotype[®], cador[®], cattletype[®], flocktype[®], pigtype[®], Svanovir[®], virotype[®] (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); ABI PRISM[®] (Applied Biosystems); Bio-Rad[™] (Bio-Rad Laboratories, Inc.); FAM[™], HEX[™], JOE[™], ROX[™] (Life Technologies Corporation); Cy[®] (GE-Healthcare); Eppendorf[®] (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH). Las sondas de las que se ha obtenido licencia han sido fabricadas por Integrated DNA Technologies, Inc. Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

HB-2575-EN-002 © 2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

Índice de cambios

Manual de uso	Versión	Cambio
HB-2575-EN-002	Julio de 2022	Cambios editoriales
HB-2575-EN-001	Marzo 2022	Lanzamiento de producto

INDICAL
BIOSCIENCE

Pedidos: www.indical.com/contact
Servicio técnico: support@indical.com
Sitio web: www.indical.com