

virotype[®] BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit

Manual de uso

Para la detección de ARN del *Bluetongue Virus* (BTV) y el serotipo europeo BTV-8

Certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal, n.º MA: FLI-C 114



100 reacciones (n.º de catálogo VT280465)



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

Contenido

Contenido.....	2
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.....	9
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario.....	10
Notas importantes	11
Precauciones generales.....	11
Protocolo: RT-PCR en tiempo real para la detección de ARN del <i>Bluetongue Virus</i> y BTV-8	14
Cuestiones importantes antes de comenzar	14
Antes de comenzar	14
Procedimiento	15
Análisis e interpretación de los datos	18
Interpretación de los resultados	18
Índice de cambios	24

Contenido del kit

virotype BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit	(100)
N.º de catálogo	VT280465
Número de reacciones	100
Master Mix (mezcla maestra) (tubo con tapón naranja); incluye enzimas, primers y sondas	1 × 800 µl
Positive Control (control positivo) (tubo con tapón rojo)	1 × 150 µl
Negative Control (control negativo) (tubo con tapón azul)	1 × 150 µl
Manual de uso	1

Uso previsto

El virotype BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit está diseñado para detectar el ARN del *Bluetongue Virus* (BTV) y diferenciar de manera específica el serotipo europeo BTV-8 en sangre total y grupos de sangre de rumiantes (preferentemente con anticoagulantes, por ejemplo sangre con EDTA) y muestras de tejido (bazo, ganglios linfáticos) de ganado vacuno, ovino y caprino.

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 114) 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 vacuno, ovino y caprino

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de INDICAL, cada lote del virotype BTV pan/8 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 BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit deben almacenarse a una temperatura comprendida entre -30 °C y -15 °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 únicamente si 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

La lengua azul es una enfermedad infecciosa no contagiosa de los rumiantes. El agente es el *Bluetongue Virus* (BTV), un virus de ARN bicatenario del género *Orbivirus* y la familia de los *Reoviridae* con 36 serotipos conocidos, incluido el BTV atípico. El BTV está presente en muchos lugares del mundo. Los ganados bovino, vacuno y caprino son los más afectados por esta enfermedad. Los síntomas clínicos más claros suelen detectarse únicamente en ovejas. En casos graves, la lengua puede reflejar hiperemia aguda y volverse cianótica (lengua azul).

El serotipo 8 del BTV (BTV-8) es especialmente relevante desde el punto de vista epidemiológico en Europa Central y es el causante de los principales brotes recientes de la enfermedad de la lengua azul. El virus se transmite a través de un tipo de mosquito del género *Culicoides*. También puede contagiarse con agujas y equipamiento quirúrgico contaminados.

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 BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit contiene todos los reactivos necesarios para la detección de ARN del BTV, incluidos un Positive Control y un Negative Control. Con este kit, tanto la transcripción inversa como la PCR tienen lugar en un tubo de reacción, lo que reduce el riesgo de contaminación.

El virotype BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit utiliza tres combinaciones específicas de primer/sonda:

- Fluorescencia FAM™ para ARN de todos los serotipos de BTV conocidos (pan BTV)
- Fluorescencia Cy®5 para ARN de serotipo europeo 8 (BTV-8)
- Fluorescencia JOE™ para el control interno endógeno (EC; β -actina presente en la muestra)

El Positive Control contiene ARN de BTV-8 y permite el control del paso de desnaturalización, ya que la desnaturalización correcta del

ARN bicatenario viral es un requisito indispensable para la amplificación.

Extracción del ARN

El virotype BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit permite detectar el ARN de BTV de sangre total de rumiantes (preferentemente con anticoagulantes, por ejemplo sangre con EDTA) y muestras de tejido (bazo, ganglios linfáticos) en ganado vacuno, ovino y caprino.

Debido a la elevada sensibilidad de la prueba, se pueden analizar agrupaciones de hasta 10 muestras individuales de sangre. Sin embargo, el tamaño óptimo de agrupación dependerá de la prevalencia del BTV en la región en cuestión.

Nota: El análisis de mezclas de muestras conlleva una disminución de la sensibilidad analítica del ensayo y por tanto la posibilidad de que no se detecten muestras débilmente positivas.

Nota: Para su uso en Alemania, se aplican las especificaciones descritas en la "*Amtliche Methodensammlung*".

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

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 Kitw/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)

Si la RT-PCR en tiempo real no se realiza inmediatamente después de la extracción, almacene el ARN a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o bien a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado.

Para obtener más información sobre la extracción automática y manual de ARN del BTV de diferentes tipos de muestras, consulte el manual respectivo 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.

- Pipetas
- Puntas de pipeta exentas de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros
- Tubos Eppendorf® de 1,5 ml estériles

- 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 el material positivo (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 BTV pan/8 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 incluye un ensayo de control de extracción y amplificación en el kit para la prueba.

El control interno endógeno (Endogenous Control, EC) detecta el gen de la β -actina presente en la muestra. De este modo se pueden supervisar los pasos de extracción y amplificación.

Protocolo: RT-PCR en tiempo real para la detección de ARN del *Bluetongue Virus* y BTV-8

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea el apartado “Notas importantes” en la página 11 antes de comenzar.
- 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. Pipetee 5 µl de muestras de ARN, el Positive Control y el Negative Control en tubos de reacción individuales. Cubra los tubos de reacción (por ejemplo, con lámina de sellado de PCR).

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.

2. Desnaturalice las muestras y los controles durante 5 min a 98 °C en un termociclador estándar de 96 pocillos con tapa calentada.
3. Enfríelos inmediatamente en agua con hielo o nitrógeno líquido durante al menos 20 s. A continuación, almacénelos en hielo o en un dispositivo para enfriamiento.
4. Antes de utilizarlos, mezcle la Master Mix mediante inversión 5 veces o hasta que se haya mezclado bien y, a continuación, centrifúguela brevemente para recoger los fluidos.
5. Pipetee 8 µl de la Master Mix en cada tubo de reacción. De esta manera, el volumen final de una prueba será de 13 µl (tabla 1).

Tabla 1. Preparación de la mezcla de reacción

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

6. Cierre los tubos de reacción con los tapones correspondientes.
7. Invierta varias veces los tubos cerrados hasta que queden bien mezclados y centrifúguelos brevemente.
8. 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
pan BTV	FAM
BTV-8	Cy5
Control interno endógeno (Endogenous Control, EC)	HEX/JOE™ ¹
Referencia pasiva ²	ROX™

1 Utilice la opción apropiada para su termociclador.

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

9. Ejecute el protocolo de PCR en tiempo real de acuerdo con la tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de RT-PCR en tiempo real para BTV pan/8 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 67 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 y HEX/JOE con un $C_T^1 < 35$. Si no se detecta ninguna señal de FAM y Cy5 de los Positive Controls, los pasos de desnaturalización y enfriamiento habrán sido insuficientes y será necesario repetir la prueba. 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 de la página 20.

Para que la muestra se considere positiva para el pan BTV y el BTV-8 y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:

- La muestra emite una señal en los canales FAM, Cy5 y HEX/JOE.
- El Positive Control emite una señal en todos los canales.
- El Negative Control no emite ninguna señal en ninguno de los canales.

Tenga en cuenta que unas concentraciones muy elevadas de ARN de BTV-8 o la presencia de inhibidores en la muestra pueden reducir la señal HEX/JOE o incluso suprimirla debido a la competición con el control interno.

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 positiva para el pan BTV, negativa para BTV-8, y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:

- La muestra emite una señal en los canales FAM y HEX/JOE, pero no en el canal Cy5.
- El Positive Control emite una señal en todos los canales.
- El Negative Control no emite ninguna señal en ninguno de los canales.

Tenga en cuenta que unas concentraciones muy elevadas de ARN de BTV-8 o la presencia de inhibidores en la muestra pueden reducir la señal HEX/JOE o incluso suprimirla debido a la competición con el control interno.

Para que la muestra se considere negativa para el pan BTV y el BTV-8, y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:

- La muestra emite una señal únicamente en el canal HEX/JOE.
- El Positive Control emite una señal en todos los canales.
- El Negative Control no emite ninguna señal en ninguno de los canales.

Con una señal positiva de HEX/JOE, se descarta la posibilidad de inhibición en la PCR o de una extracción del ARN incorrecta, dado que se amplifica el control interno.

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 de fluorescencia.

Si no se detecta ninguna señal en los canales FAM (pan BTV), Cy5 (BTV-8) y HEX/JOE (control interno endógeno, EC), el resultado es no concluyente. La ausencia de señal para el gen constitutivo indica una inhibición marcada de la PCR u otro error, por ejemplo, durante la extracción.

Para realizar una comprobación de inhibición, recomendamos una dilución 1:5 del ARN de muestra en agua sin nucleasa, para 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 todos los canales 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 desnaturalización incorrecta del ARN o a condiciones inadecuadas de los ciclos.

Tabla 4. Tabla de interpretación de resultados*

Resultado de la muestra	FAM (pan BTV)	Cy5 (BTV-8)	HEX (EC)
Positivo en pan BTV	X		(X)
Positivo en pan BTV y BTV-8	X	X	(X)
Negativo en BTV			X
No concluyente			

* 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, Cy5 y HEX/JOE. 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 18.

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 los 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

Acuordo de licencia limitada para el virotype BTV pan/8 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-2578-EN-001 © 2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

Índice de cambios

Manual de uso	Versión	Cambio
HB-2578-EN-001	Julio 2022	Lanzamiento de producto