

virotype[®] SBV 2.0

RT-PCR Kit

Gebrauchsinformation

Zum Nachweis von RNA des
Schmallenberg-Virus (SBV)

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 11 Absatz 2 TierGesG
zugelassen. Zulassungs-Nr.: FLI-C 115



100 Reaktionen (Katalog-Nr. VT281625)



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

INDICAL
BIOSCIENCE

Inhalt

Kit-Inhalt.....	3
Verwendungszweck.....	3
Symbole.....	4
Qualitätskontrolle.....	4
Lagerung.....	5
Sicherheitshinweise.....	5
Einleitung.....	6
Testprinzip.....	7
RNA-Extraktion.....	8
Zusätzlich benötigte Materialien.....	9
Wichtige Hinweise.....	10
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen.....	10
Protokoll: Real-time RT-PCR zum Nachweis der RNA des <i>Schmallenberg-Virus</i>	12
Wichtige Hinweise vor Beginn.....	12
Vorbereitungen.....	12
Durchführung.....	13
Auswertung.....	15
Interpretation der Ergebnisse.....	15
Änderungsindex.....	20

Kit-Inhalt

virotype SBV 2.0 RT-PCR Kit	(100)
Katalog-Nr.	VT281625
Anzahl der Reaktionen	100

Master Mix (Master-Mix, orangefarbener Deckel), enthält Primer, Sonden und Enzyme	1 x 800 µl
Positive Control (Positivkontrolle, roter Deckel)	1 x 150 µl
Negative Control (Negativkontrolle, blauer Deckel)	1 x 150 µl
Gebrauchsinformation	1

Verwendungszweck

Der virotype SBV 2.0 RT-PCR Kit ist ein real-time RT-PCR Kit, vorgesehen zum Nachweis der RNA des *Schmallenberg-Virus* (SBV) mittels real-time RT-PCR in Gewebeproben, Serum, Blut, Sperma und Mekonium (-tupfern) von Rindern, Schafen und Ziegen.

Der Kit besitzt die Zulassung des Friedrich-Loeffler-Instituts nach § 11 Absatz 2 TierGesG mit der Zulassungsnummer FLI-C 115.

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 Rind, Schaf und Ziege

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von INDICAL wird jede Charge des Tests virotype SBV 2.0 RT-PCR Kits nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Lagerung

Die Komponenten des virotype SBV 2.0 RT-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 (> 3x), 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

Das *Schmallenberg-Virus* (SBV) ist ein behülltes RNA-Virus mit einzelsträngigem, segmentiertem Genom, das zur Gattung *Orthobunyavirus* innerhalb der Familie *Bunyaviridae* gehört. Die Übertragung erfolgt über Gnizen (*Culicoides* spp.) und Stechmücken. Eine direkte Übertragung von Tier zu Tier ist unwahrscheinlich, aber eine vertikale Übertragung über den intrauterinen Weg vom Muttertier auf den Fötus ist möglich.

Erwachsene Rinder zeigen eine kurze klinische Phase mit Rückgang der Milchleistung, Durchfall und hohem Fieber. Bei Schafen äußert sich die Infektion hauptsächlich durch Mattigkeit und Durchfall. Je nach Infektionszeitpunkt während der Gravidität kommt es zum Verlust des Embryos, Mumifizierungen, Aborten, Totgeburten oder kongenitalen Missbildungen in Form des Arthrogrypose-Hydranencephalie-Syndroms (AHS).

Durch seine hohe Sensitivität ermöglicht der virotype SBV 2.0 RT-PCR Kit den sicheren und frühzeitigen Nachweis der viralen RNA in Proben von Wiederkäuern.

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 („real-time PCR“) ermöglicht den Nachweis des sich anreichernden Produkts, ohne die Reaktionsgefäße danach wieder öffnen zu müssen.

Der virotype SBV 2.0 RT-PCR Kit enthält alle Reagenzien, die für den Nachweis der SBV-RNA notwendig sind, einschließlich Positiv- und Negativkontrolle. Mit diesem Kit werden reverse Transkription und PCR im gleichen Reaktionsgefäß durchgeführt, welches die Kontaminationsgefahr verringert.

Im Kit werden zwei spezifische Primer-Sonden-Kombinationen verwendet:

- FAM™-Fluoreszenz für SBV-RNA
- HEX™-Fluoreszenz für die endogene interne Kontrolle (EC, Beta-Actin aus der Probe)

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

RNA-Extraktion

Der virotype SBV 2.0 RT-PCR Kit ist ein real-time RT-PCR Kit, vorgesehen zum Nachweis von SBV-RNA aus Gewebeproben, Serum, Blut (Einzel- und Poolproben), Sperma und Mekoniumproben von Wiederkäuern.

Aufgrund der hohen Sensitivität des Tests können Poolproben aus bis zu 5 Blut- bzw. Serumproben untersucht werden. Ein Zusammenführen (Poolen) von Proben ist nach Maßgabe der Amtlichen Methodensammlung möglich.

Vor der real-time PCR muss die virale RNA aus dem Ausgangsmaterial extrahiert werden. INDICAL bietet für die RNA-Extraktion aus Tierproben validierte Produkte an.

Extraktionskits mittels "magnetic bead"-Verfahren:

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

Extraktionskits mit Verwendung von Spin Columns:

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

Falls die real-time RT-PCR nicht unmittelbar nach der Extraktion durchgeführt wird, lagern Sie die RNA bei -20°C, bzw. bei -70°C für längere Zeit.

Für weitere Informationen zur automatisierten oder manuellen Extraktion von SBV-RNA aus verschiedenen Probenmatrices, lesen Sie

entweder das entsprechende Handbuch oder kontaktieren Sie den INDICAL Support unter **support@indical.com**.

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 Invertieren 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 virale RNA enthält. Mit einer Positivkontrolle wird die Funktionalität des Pathogentests

nachgewiesen, also zum Beispiel das korrekte Ansetzen des Reaktionsgemisches. Setzen Sie 5 µl der im virotype SBV 2.0 RT-PCR Kit mitgelieferten Positivkontrolle ein, um die erfolgreiche Amplifikation der Zielsequenz zu überprüfen.

Extraktions- und Amplifikationskontrolle

Zusätzliche Prozesssicherheit und Benutzerfreundlichkeit wird durch ein internes Kontrollsystem gewährleistet, das im Testkit enthalten ist und ein in der Probe vorhandenes Housekeeping-Gen nachweist. Damit ist eine Kontrolle sowohl der Extraktion als auch der Amplifikation möglich.

Protokoll: Real-time RT-PCR zum Nachweis der RNA des *Schmallenberg-Virus*

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.
- RNA ist instabil. Führen Sie das Protokoll ohne Unterbrechungen durch.

Vorbereitungen

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

Durchführung

1. Vor Beginn den Master-Mix gut mischen (z.B. 5x invertieren), anschließend kurz zentrifugieren.
2. 8 µl des Master-Mix in jedes Reaktionsgefäß pipettieren. Dann 5 µl der RNA-Probe hinzugeben (Tabelle 1).

Führen Sie Positiv- und Negativkontrolle mit.

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

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

Tabelle 1. Ansetzen des Reaktionsgemisches

Komponente	Volumen
Master-Mix	8 µl
Probe	5 µl
Gesamtvolumen	13 µl

3. Die Reaktionsgefäße mit den passenden Deckeln oder die PCR-Platte mit Folie verschließen und 5x invertieren. Anschließend kurz zentrifugieren, um das Reaktionsgemisch am Boden der Vertiefungen zu sammeln.

4. In der Software des Thermocyclers die Filter für die Reporter gemäß Tabelle 2 einstellen.

Tabelle 2. Filtereinstellungen für den Reporter

Pathogen/ interne Kontrolle	Reporter
SBV	FAM
Endogene interne Kontrolle (EC)	HEX/ JOE™ ¹
Passive Referenz ²	ROX™

1 Verwenden Sie die für den gewählten Thermocycler geeignete Einstellung

2 Interne Referenz für ABI PRISM® Sequence Detection Systems (Applied Biosystems®)

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

Tabelle 3. Real-time RT-PCR Protokoll für SBV 2.0

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Reverse Transkription	50°C	10 min	1
Initiale Aktivierung	95°C	2 min	1
2-Schritt-Cycling			
Denaturierung	95°C	5 s	40
Annealing/ Extension*	60°C	30 s	

* Erfassung der Fluoreszenzdaten. PCR-Laufzeit ca. 64 min (CFX96, BioRad™)

Auswertung

Interpretation der Ergebnisse

Für eine gültige Messung müssen das FAM- und das HEX-Signal der Positivkontrolle einen C_T -Wert¹ kleiner als 35 ergeben ($C_T < 35$). Die Negativkontrolle darf kein Signal in einem der Fluoreszenzkanäle aufweisen.

Bei der Arbeit mit unbekanntem Proben sind die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse möglich. Eine Zusammenfassung der möglichen Resultate finden Sie auch in Tabelle 4 auf Seite 17.

Das Testergebnis ist positiv für SBV und der Test ist gültig, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Die Probe zeigt ein Signal sowohl im FAM- als auch im HEX-Kanal.
- Die Positivkontrolle zeigt ein Signal sowohl im FAM- als auch im HEX-Kanal.
- Die Negativkontrolle zeigt weder im FAM-Kanal noch im HEX-Kanal ein Signal.

Bei sehr hohen Ausgangskonzentrationen an SBV-RNA in der Probe kann es durch Konkurrenz mit dem internen Kontrollsystem (EC) zu schwachen oder ausbleibenden HEX-Signalen kommen.

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

Das Testergebnis ist negativ für SBV und der Test ist gültig, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Die Probe zeigt ein Signal nur im HEX-Kanal, jedoch kein Signal im FAM-Kanal.
- Die Positivkontrolle zeigt ein Signal sowohl im FAM- als auch im HEX-Kanal.
- Die Negativkontrolle zeigt weder im FAM-Kanal noch im HEX-Kanal ein Signal.

Die Detektion eines HEX-Signals bedeutet, dass Extraktion und Amplifikation erfolgreich verlaufen sind, da das Housekeeping-Gen (β -Aktin) aus der Probe amplifiziert wurde.

Eine diagnostische Aussage ist nicht möglich und der Test ist ungültig, wenn folgende Situation auftritt:

- Die Probe zeigt weder im FAM- noch im HEX-Kanal ein Signal.

Wenn weder im FAM-Kanal (SBV) noch im HEX-Kanal (endogene interne Kontrolle, EC) ein Signal detektiert wurde, ist eine diagnostische Aussage nicht möglich. Das Ausbleiben eines Signals für die endogene interne Kontrolle (EC) weist auf eine starke Inhibition der PCR und/oder andere Probleme hin (z.B. während der Extraktion).

Zur Prüfung, ob eine Inhibition vorliegt, empfehlen wir, die jeweiligen RNA-Einzelproben 1:5 in Nuklease-freiem Wasser zu verdünnen, die RNA-Extraktion oder den gesamten Test mit frischem Probenmaterial zu wiederholen.

Überprüfen Sie, ob für die Positivkontrolle ein FAM und HEX-Signal detektiert wurde. Ein Ausbleiben dieser Signale für die Positivkontrolle weist auf einen Fehler hin, beispielsweise einen Fehler beim Ansetzen

des Master-Mixes oder eine fehlerhafte Programmierung des PCR-Gerätes.

Tabelle 4. Tabelle zur Interpretation der Ergebnisse*

Ergebnis der Probe	FAM (SBV)	HEX (EC)
SBV-positiv	X	X
SBV stark-positiv	X	
SBV-negativ		X
Uneindeutig		

* Die Ergebnisse können entsprechend interpretiert werden, vorausgesetzt, dass sowohl Positiv- als auch Negativkontrolle mitgetestet wurden. Die Positivkontrolle muss ein Signal sowohl im FAM- als auch im HEX-Kanal zeigen. Die Negativkontrolle darf kein Signal zeigen. Eine ausführliche Erklärung aller möglichen Resultate finden Sie im Abschnitt „Auswertung“ ab Seite 16.

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 afosa, bactotype, cadon, cattletype, flocktype, pigtype, Svanovir und virotype finden Sie im Internet unter **www.indical.com**.

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

Notizen

Notizen

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarungen für den virotype SBV 2.0 RT-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: 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); 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-2580-DE-001 © 2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, alle Rechte vorbehalten.

Änderungsindex

Gebrauchsinformation	Version	Änderung
HB-2580-DE-001	Juli 2022	Produkt-Launch