

## Gebrauchsanweisung

# virellaBVDV 2.0

## real time RT-PCR Kit

Für den *in-vitro* Nachweis von RNA des Bovinen Viralen Diarrhoe-Virus (BVDV) in Einzel- oder Poolproben von EDTA-Blut, Plasma, Serum und Gewebeproben (z.B. Ohrstanzen) von Rindern.

*Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17c TierSG zugelassen.*

Zul.-Nr. FLI-B 637



G01079



100



gerbion GmbH & Co. KG  
Remsstr. 1  
70806 Kornwestheim  
Germany

phone: +49 7154 806 20 0

fax: + 49 7154 806 20 29

e-mail: [info@gerbion.com](mailto:info@gerbion.com)

[www.gerbion.com](http://www.gerbion.com)



## Inhaltsverzeichnis

1	Anwendungszweck .....	3
2	Anwendungsbereich .....	3
3	Testprinzip .....	3
4	Komponenten .....	4
5	Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte .....	4
6	Transport, Lagerung und Haltbarkeit .....	5
7	Wichtige Hinweise .....	5
8	Allgemeine Hinweise .....	5
9	Art und Beschaffenheit des Probenmaterials .....	6
10	Probenvorbereitung .....	6
11	Kontroll-RNA (K5) .....	7
12	Real time PCR .....	8
12.1	Wichtige Punkte bevor Sie starten: .....	8
12.2	Durchführung .....	8
12.3	Geräteeinstellungen .....	10
13	Validierung .....	11
14	Interpretation der Ergebnisse .....	12
15	Troubleshooting .....	14
16	Abkürzungen und Symbole .....	16

## 1 Anwendungszweck

Der virellaBVDV 2.0 real time RT-PCR Kit dient dem Nachweis der RNA des Bovinen Viralen Diarrhoe Virus in Einzel- oder Poolproben von EDTA, Blut, Plasma, Serum, Gewebeproben (z.B. Ohrstanzen) von Rindern. Der Test weist alle bekannten Typen des BVD-Virus vom Rind nach.

## 2 Anwendungsbereich

Infektionen mit dem Virus der Bovinen Virus Diarrhoe (BVD) verursachen jährlich große ökonomische Verluste in der Milch- und Fleischindustrie.

Das BVD Virus (BVDV) kann spontane Aborte verursachen oder führt durch transplazentale Übertragung des Virus auf Föten zu persistent infizierten (PI) Tieren. Die Identifizierung der PI Tiere erlaubt die Eliminierung von Quellen der Reinfektion. BVDV ist zudem Auslöser der Mucosal Disease (MD).

## 3 Testprinzip

Der virellaBVDV 2.0 real time RT-PCR Kit enthält spezifische Primer und Hydrolyse-Sonden für den Nachweis der RNA des Bovinen Viralen Diarrhoe-Virus in Einzel- oder Poolproben von Rindern. Geeignet sind EDTA Blut, Plasma, Serum nach vorausgegangener RNA-Extraktion bzw. Gewebeproben (Ohrstanzen) nach vorausgegangenem Aufschluss des Gewebes.

Die reverse Transkription (RT) der möglicherweise enthaltenen viralen RNA zu cDNA und die anschließende Amplifikation von BVDV-spezifischen Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion erfolgen in einem Schritt.

Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der BVDV spezifischen TaqMan® Sonden mittels FAM™ Fluoreszenz.

Zusätzlich verfügt die virellaBVDV 2.0 real time RT-PCR über ein zweites heterologes Amplifikationssystem, um den Erfolg der RNA-Extraktion zu überprüfen und eine mögliche Inhibition der RT-PCR Reaktion zu identifizieren.

Hierzu dient die reverse Transkription und Amplifikation einer Kontroll-RNA, welche entweder vor der RNA-Extraktion zugefügt wird (z.B. bei Blutproben) und somit gleichzeitig als Extraktionskontrolle dient, oder dem Mastermix zupipettiert wird (z.B. bei Gewebeaufschlüssen). In der real time RT-PCR erzeugt die Kontroll-RNA ein Fluoreszenzsignal im Kanal VIC®/HEX/JOE™/TET.

## 4 Komponenten

Die Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 100 Nachweisreaktionen.

**Tabelle 1:** Komponenten des virellaBVDV 2.0 real time RT-PCR Kit.

	Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt
K1	Reaktionsmix	gelb	2 x 1035 µl
K2	Enzym	blau	1 x 30 µl
K3	Positivkontrolle	rot	1 x 100 µl
K4	Negativkontrolle	grün	1 x 100 µl
K5	Kontroll-RNA	farblos	2 x 240 µl

## 5 Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- bei Blutproben: RNA Extraktions-Kit
- bei Gewebeproben: Reagenz zum Gewebeaufschluss
- Reinstwasser (PCR grade Water)
- sterile Reaktionsgefäße mit Verschluss
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortexer
- Thermoblock
- real time PCR Gerät
- optische PCR Gefäße mit Verschluss
- Optional: Pipettiergeräte zur Automation

## 6 Transport, Lagerung und Haltbarkeit

Der Transport des virellaBVDV 2.0 real time RT-PCR Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten des virellaBVDV 2.0 real time RT-PCR Kit sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei -18°C oder niedrigeren Temperaturen zu lagern. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden!

Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal sechs Monate verwendbar. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren (> zweimal) der Reagenzien vermeiden, da dadurch die Sensitivität verringert werden kann. Gegebenenfalls sollten die Kitkomponenten K1, K3 und K5 aliquotiert werden.

## 7 Wichtige Hinweise

- Die virellaBVDV 2.0 real time RT-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der Good Laboratory Practice (GLP) sind einzuhalten.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.

## 8 Allgemeine Hinweise

- Die Anweisungen der Gebrauchsinformation sind einzuhalten.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Masternix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Das Enzym (K2) ist auch bei -18°C flüssig. Das Enzym (K2) erst unmittelbar vor Gebrauch aus dem Gefrierschrank entnehmen, unmittelbar nach Gebrauch in den Gefrierschrank zurückstellen.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Komponenten verschiedener Chargen der virellaBVDV 2.0 real time RT-PCR dürfen nicht zusammen verwendet werden.

## 9 Art und Beschaffenheit des Probenmaterials

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist virale RNA, die aus Gewebeproben (z.B. Ohrstanzen), EDTA-Blut, Plasma oder Serum isoliert wurde. Für alle Probenmaterialien ist ein Pool von bis zu 50 Einzelproben möglich. Bei einer Direktlyse von Gewebeproben ist eine Poolgröße von bis zu 24 möglich. Die geeignete Poolgröße hängt von der BVDV-Prävalenz im Gebiet, aus dem die Proben stammen, und vom Alter der Tiere ab.

## 10 Probenvorbereitung

Die virellaBVDV 2.0 real time RT-PCR ist geeignet für den Nachweis von BVDV-RNA in Einzel- oder Poolproben von Rindern (EDTA-Blut, Plasma, Serum nach vorausgegangener RNA-Extraktion bzw. Ohrstanzproben nach vorausgegangenem Aufschluss des Gewebes). Es wird empfohlen, kommerziell erhältliche Extraktionskits zu verwenden.

Extraktion von EDTA-Blut, Plasma, Serum, z.B.:

- NukEx Complete RNA/DNA, gerbion Art. Nr. G05020
- NukEx Complete Mag RNA/DNA, gerbion Art. Nr. G05021
- ZR Viral RNA Kit™ (Zymo Research)
- High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Aufschluss von Gewebeproben (Ohrstanzproben), z.B.:

- NukEx Nucleic Acid Release Reagent (gerbion)

**Wichtig:** Bei Blutproben sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Probe behandelt werden. Bei Gewebeproben sollte in der RT-PCR zusätzlich zu den Proben eine Kontrolle mit Lysereagenz mitgeführt werden.

**Beachten Sie bitte auch den Abschnitt „Kontroll-RNA“, Seite 7.**

Falls die real time RT-PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die RNA-Extrakte entsprechend den Angaben des RNA-Extraktionskit Herstellers aufbewahrt werden.

Weitere Informationen zur Isolierung von RNA erhalten Sie in der Gebrauchsinformation des Extraktionskits oder vom technischen Service des RNA-Extraktionskit Herstellers.

## Poolen von Proben

### EDTA-Blutproben, Serum- und Plasmaproben

Gleichgroße Aliquots (z.B. je 100 µl) von bis zu 50 Einzelproben poolen und gut mischen (vortexen), anschließend RNA extrahieren.

### Gewebeproben (Ohrstanzen)

Gleichgroße Aliquots (z.B. je 10 µl) der Aufschlussüberstände von bis zu 24 Einzelproben poolen und danach gut mischen (vortexen).

**Beachte:** Verunreinigungen der Gewebeproben durch Trocknungsmittel können zu Inhibitionen der RT-PCR führen. Aufschlussüberstände, die in der Erstuntersuchung mit dem virellaBVDV 2.0 real time RT-PCR Kit stark inhibiert waren, sollten vor einem erneuten PCR-Lauf in einem geeigneten Verdünnungspuffer (z.B. NukEx Universal Dilution Buffer, gerbion Art.Nr. G01014) verdünnt werden.

## 11 Kontroll-RNA (K5)

Der virellaBVDV 2.0 real time RT-PCR Kit enthält eine Kontroll-RNA (K5), die zum einen als Kontrolle der RNA-Extraktion dient, zum anderen als interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der Reversen Transkription bzw. der PCR aufzeigt.

### Kontroll RNA (K5) als Extraktionskontrolle verwenden (Blut, Plasma, Serum etc.):

Die Kontroll-RNA (K5) wird jeder Probe vor der eigentlichen Extraktion beigemischt. Dazu das für eine Extraktion benötigte Puffervolumen mit der Anzahl (N) der durchzuführenden Extraktionen multiplizieren und zum Ausgleich der Pipettierungenauigkeit einen zusätzlichen Ansatz berechnen.

Von der Kontroll-RNA 5 µl pro Extraktion (also  $5 \mu\text{l} \times (N+1)$ ) hinzupipettieren.

**Wird die Probe im ersten Puffer des Extraktionskit inkubiert, so wird die Kontroll-RNA (K5) erst nach der Inkubation jeder Probe einzeln zugefügt.**

**Die Kontroll-RNA (K5) darf nicht dem Probenmaterial direkt zugemischt werden.**

**Folgen Sie Protokoll A zum Ansetzen der real time RT-PCR.**

### Kontroll-RNA (K5) als Interne Kontrolle der real time RT-PCR verwenden (Gewebeproben):

Werden Gewebelysate ohne weitere RNA-Aufreinigung direkt in die real time RT-PCR eingesetzt, so kann die Kontroll-RNA (K5) dem PCR Mastermix zupipettiert werden und so als interne RT-PCR-Kontrolle mögliche Inhibitionen aufdecken.

**Folgen Sie Protokoll B zum Ansetzen der real time RT-PCR.**

## 12 Real time PCR

### 12.1 Wichtige Punkte bevor Sie starten:

- Bitte beachten sie die ‚Wichtigen Hinweise‘ auf Seite 5.
- Bevor Sie die PCR ansetzen machen Sie sich mit dem real time PCR Gerät vertraut. Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR Lauf mindestens eine Positivkontrolle (K3), und eine Negativkontrolle (K4) enthalten sein sollte.
- Alle Reagenzien - bis auf das Enzym (K2) - müssen komplett aufgetaut, gemischt (Reaktions-Mix (K1) nicht vortexen, sondern durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mischen) und kurz abzentrifugiert werden. Halten Sie die Reagenzien stetig gekühlt in einem Kühlblock (+2 bis +8°C) oder auf Eis.

### 12.2 Durchführung

Falls die Kontroll-RNA (K5) als Extraktionskontrolle verwendet wird, bitte Protokoll A folgen. Wird die Kontroll-RNA (K5) nur zur Kontrolle einer möglichen Inhibition der real time RT-PCR verwendet (bei direktem Einsatz der Aufschlussüberstände), bitte Protokoll B befolgen.

#### Protokoll A (RNA Extrakte)

**Die Kontroll-RNA (K5) wurde zur RNA-Extraktion bereits zugegeben (siehe „Kontroll-RNA“, Seite 7). In diesem Fall wird der Mastermix gemäß Tabelle 2 angesetzt.**

Der Mastermix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.



**Tabelle 2:** Herstellung des Mastermix (Kontroll-RNA (K5) wurde während der RNA-Extraktion zugefügt)

Reaktionsvolumen	Mastermix Volumen
20,7 µl Reaktionsmix (K1)	20,7 µl x (N+1)
0,3 µl Enzym (K2)	0,3 µl x (N+1)

**Protokoll B (Aufschlussüberstände von Gewebeprobe)**

Die Kontroll-RNA (K5) wird ausschließlich zur Kontrolle der real time RT-PCR verwendet (siehe „Kontroll-RNA“, Seite 7). In diesem Fall wird der Mastermix gemäß Tabelle 3 angesetzt.

Der Mastermix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

**Tabelle 3:** Herstellung des Mastermix (die Kontroll-RNA (K5) wird dem Mastermix beigemischt)

Reaktionsvolumen	Mastermix Volumen
20,7 µl Reaktionsmix (K1)	20,7 µl x (N+1)
0,2 µl Kontroll-RNA (K5)	0,2 µl x (N+1)
0,3 µl Enzym (K2)	0,3 µl x (N+1)

\*Die durch Zugabe der Kontroll-RNA (K5) verursachte Volumenerhöhung kann vernachlässigt werden. Die Sensitivität des Nachweissystems ist dadurch nicht beeinträchtigt.

**Protokoll A und B: Ansetzen der real time RT-PCR**

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in die dafür vorgesehene Aufnahmevorrichtung des verwendeten real time PCR Geräts stellen.
- **21 µl** des Mastermix in jedes Gefäß pipettieren.
- **4 µl** der RNA-Eluat (inklusive Eluate der Wasserkontrollen), der Positivkontrolle (K3) und der Negativkontrolle (K4) in die entsprechenden Gefäße hinzupipettieren (Tabelle 4).
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

**Tabelle 4:** Ansetzen der real time RT-PCR.

Komponente	Volumen
Mastermix	21,0 µl
Probe	4,0 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl

### 12.3 Geräteeinstellungen

Für die real time RT-PCR das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil benutzen.

**Tabelle 5:** real time RT-PCR Temperaturprofil

Bezeichnung	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
<i>Reverse Transkription</i>	20 min	45°C	1
<i>Initiale Denaturierung</i>	5 min	95°C	1
<b>Amplifikation der cDNA</b>			
Denaturierung	15 sec	95°C	45
Annealing und Elongation	40 sec	56°C	
	Messung am Ende dieses Schrittes		
Extension	15 sec	72°C	

Je nach real time PCR Gerät sind weitere Geräteeinstellungen vorzunehmen. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die notwendigen Einstellungen bei gängigen Geräten.

**Tabelle 6:** Übersicht über die notwendigen Geräteeinstellungen

Real time PCR Gerät	Parameter	Detektions-Kanal	Bemerkungen
LightCycler 480II	BVDV	465-510	vorinstallierte CC, z.B. Universal CC FAM (510)
	Kontroll-RNA	533-580	- VIC (580)
Stratagene Mx3000P / Mx3005P	BVDV	FAM	Reference Dye: None
	Kontroll-RNA	HEX	
ABI 7500, 7900, One Step (Plus)	BVDV	FAM	Reference Dye ROX: NO
	Kontroll-RNA	JOE	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000	BVDV	Green	Gain 5
Rotor-Gene 6000	Kontroll-RNA	Yellow	Gain 5

### 1.3 Validierung

Setzen Sie den Threshold wie folgt:

#### Negativkontrolle

Die Negativkontrolle muss im FAM-Kanal unterhalb des Thresholds liegen. Bei einer potentiellen Kontamination dieser Kontrolle (Auftreten einer Kurve) sind die Ergebnisse des Testes nicht auswertbar. Der Test muss wiederholt werden.

#### Positivkontrolle

Die Positivkontrolle muss im FAM-Kanal einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Der  $C_T$  Wert der Positivkontrolle muss  $< 30$  sein. Eine Positivkontrolle außerhalb dieses Bereichs gibt einen Hinweis auf ein Problem bei der Amplifikation. In diesem Fall muss der Test wiederholt werden.

#### Interne Kontrolle/ Kontroll-RNA

Alle internen Kontrollen müssen im VIC®/HEX/JOE™/TET-Kanal einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Die  $C_T$  Werte der internen Kontrollen müssen  $< 35$  sein. Ein Signal der internen Kontrolle höher  $C_T 35$ , deutet auf ein Problem mit der Probenvorbereitung/ Probenaufreinigung hin. Wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt, muss auch hier der  $C_T$  Wert  $< 35$  sein.

Stark positive Proben können zu einer Inhibition der internen Kontrolle führen. In dem Fall ist das Ergebnis der Probe valide.

## 14 Interpretation der Ergebnisse

Die BVDV-spezifische Amplifikation wird im FAM-Kanal detektiert. Die Amplifikation der Kontroll-RNA (K5) wird im VIC®/HEX/JOE™/TET-Kanal gemessen.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

CT Werte		Interpretation
FAM-Kanal	HEX-Kanal	
≤45	pos o. neg	<b>Das Ergebnis ist positiv, die Probe enthält BVDV-RNA.</b> In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im VIC®/HEX/JOE™/TET Kanal nicht notwendig, da eine hohe BVDV cDNA-Konzentration zu einem verminderten bzw. fehlenden Fluoreszenzsignal der Kontroll-RNA führen kann (Kompetition).
neg	≤35*	<b>Das Ergebnis ist negativ, die Probe enthält keine BVDV-RNA.</b> Das detektierte Signal der Kontroll-RNA (K5) schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften RNA-Extraktion aus (falls die Kontroll-RNA (K5) als Extraktionskontrolle benutzt wurde). Außerdem sind weder die Reverse Transkription noch die PCR komplett inhibiert. Unterscheidet sich der CT-Wert der internen Kontrolle der Wasserkontrolle stark von dem der Probe, so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht erkannt werden (siehe „Troubleshooting“, Seite 14).
neg	> 35*	<b>Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden.</b> Die real time PCR wurde inhibiert, oder es trat ein Fehler bei der DNA-Extraktion auf.
neg	neg	<b>Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden.</b> Die real time RT-PCR wurde inhibiert, oder es trat ein Fehler bei der DNA-Extraktion auf. Wurde die Kontroll-RNA (K5) während der RNA-Extraktion und nicht direkt in den PCR Mastermix zugefügt, dann ist die Negativkontrolle (K4) in beiden Kanälen negativ.

\*Je nach Gerät und verwendeter Extraktionsmethode können sich die C<sub>T</sub> Bereiche der Kontroll-RNA etwas verschieben. Als Referenz dient der C<sub>T</sub> -Wert der ebenfalls extrahierten Wasserkontrolle. Unterscheidet sich der C<sub>T</sub> -Wert der internen Kontrolle der Wasserkontrolle stark von dem der Probe, so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht erkannt werden (siehe „Troubleshooting“, Seite 14).

- Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen Beispiele für positive und negative real time RT-PCR Ergebnisse.

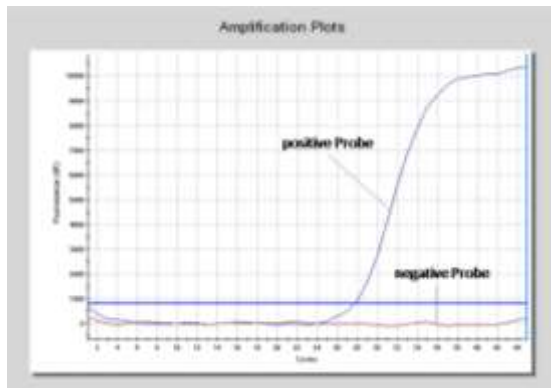


Abbildung 1: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im BVDV-spezifischen FAM-Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

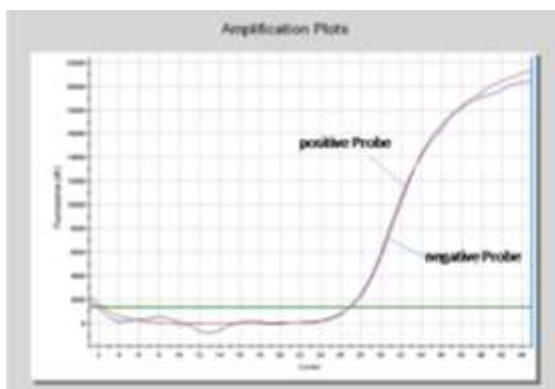


Abbildung 2: Im VIC®/HEX/JOE™/TET-Kanal zeigen sowohl die positive als auch die negative Probe ein Signal auf. In diesem Fall liegt keine Inhibition der real time RT-PCR vor, auch verlief die RNA-Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

## 15 Troubleshooting

Der folgende Troubleshooting Guide soll bei eventuell auftretenden Problemen mit der real time PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an unsere Wissenschaftler unter [info@gerbion.com](mailto:info@gerbion.com).

### Kein Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal der Positivkontrolle (K3)







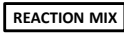






Der gewählte Kanal entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen	Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der BVDV-spezifischen Amplifikation und den VIC <sup>®</sup> /HEX/JOE <sup>™</sup> /TET- Kanal für die Amplifikation der Kontroll-RNA.
Fehlerhaftes Ansetzen der real time PCR	Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den in „Durchführung“ auf den Seiten 8 folgende beschriebenen.
Fehlerhaftes real time RT-PCR Temperaturprofil	Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (Tabelle 5, Seite 10).
Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum	Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie auf Seite 5 unter „Transport, Lagerung und Haltbarkeit“ beschrieben.

### Schwaches, sehr frühes, oder kein Signal der Kontroll-RNA (K5) und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM-Kanal

Die real time RT-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein	Überprüfen Sie die real time RT-PCR-Bedingungen (Seite 10).
real time RT-PCR Inhibition	Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe „Probenvorbereitung“, Seite 6) und beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden (ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei hoher Geschwindigkeit vor der RNA Elution wird empfohlen). Gewebeproben sollten in einem geeigneten Verdünnungspuffer (z.B NukEx Universal Dilution Buffer, gerbion Art.Nr. G01014) verdünnt werden, bevor sie erneut in die real time RT-PCR eingesetzt werden.

Verlust der DNA während des Aufarbeitungsprozesses	Falls die Kontroll-RNA (K5) vor der Extraktion zugefügt wurde, kann das Ausbleiben des Signals auf eine fehlerhafte RNA-Extraktion hinweisen. Stellen Sie sicher, dass sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden (kommerziell erhältliche Kits werden empfohlen). Halten Sie sich an das Herstellerprotokoll.
Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum	Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie auf Seite 5 unter „Transport, Lagerung und Haltbarkeit“ beschrieben.
<b>Detektion eines Signals im FAM-Kanal der Negativkontrolle (K4)</b>	
Kontamination des real time RT-PCR Ansatzes	Wiederholen Sie die real time RT-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle (K3) zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Falls die Negativkontrolle (K4) in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM-Kanal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die real time RT-PCR mit einem neuen Kit.

## 16 Abkürzungen und Symbole

BVDV	Bovine Virus Diarrhoe Virus		Artikelnummer
BVD	Bovine Virus Diarrhoe		Inhalt ausreichend für x Prüfungen
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure		Obere Temperaturbegrenzung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion		Hersteller
RNA	Ribonukleinsäure		Verwendbar bis JJJJ-MM
RT	Reverse Transkription		Chargenbezeichnung
	Reaktionsmix (K1)		Inhalt
	Enzym (K2)		Gebrauchsanweisung beachten
	Positivkontrolle (K3)		
	Negativkontrolle (K4)		
	Kontroll-RNA (K5)		