



Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Virali dei Lagomorfi
OIE Reference Laboratory for Rabbit Haemorrhagic Disease
Tel. 0302290298 - Fax 0302290623
Email: antonio.lavazza@izsler.it; lorenzo.capucci@izsler.it

Indicazioni per la diagnosi di RHD da ceppo RHDV2 mediante One Step RT-PCR (release aprile 2017)

Primers utilizzati per amplificare mediante One Step RT-PCR una porzione del gene VP60 di RHDV

- **RHDV-F/RHDV-R:** questa coppia di primers amplifica tutte le varianti note (RHDVa, RHDV e RHDV2) ed il frammento atteso è di 348pb.
- **Fra109F/Fra567R** questa coppia di primers amplifica solo RHDV2 ed il frammento atteso è di 481pb.

Primers	Sequenza 5'- 3'	Dimensione
RHDV-F	5'-CCTGTTACCATCACCATGCC -3'	20nt
RHDV-Rnew	5'-CAAGTTCCARTGCTGTTGCA -3'	21nt
Fra109-F	5'- ACTACTAGCGTGGTCACCACC -3'	21nt
Fra567-R	5'- TTGTTATAAACGCTCAGGACCAAC -3'	24nt

Allestimento della reazione One Step RT-PCR (Qiagen kit)

REAGENTS	Conc. finale	Volumi
Acqua RNase-free	//	13.5 µl
Tampone 5X	1x	5 µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme mix		1 µl
RNase-inhibitor (40u/µl)	0.4u/µl	0.25 µl
Primer-F (20pmol/µl)	0.6pmol/µl	0.75 µl
Primer-R (20pmol/µl)	0.6pmol/µl	0.75 µl
dNTPs (10mM each)	0.4 mM	1 µl
RNA		3µl
Volume finale		25µl



Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Virali dei Lagomorfi
OIE Reference Laboratory for Rabbit Haemorrhagic Disease
Tel. 0302290298 - Fax 0302290623
Email: antonio.lavazza@izsler.it; lorenzo.capucci@izsler.it

Profilo termico della reazione One Step RT-PCR

Step	Temp.	Time	N° cycles
Retrotrascrizione	50°C	30 min	1
Denaturazione iniziale	95°C	15 min	1
Denaturazione	95°C	30 sec	40
Annealing	60°C	30 sec	
Estensione	72°C	30 sec	
Estensione finale	72°C	10 min	
//	4°C	∞	1

Riferimento Bibliografico

VELARDE ROSER, CAVADINI PATRIZIA, NEIMANIS ALEKSIJA, CABEZÓN OSCAR, CHIARI MARIO, GAFFURI ALESSANDRA, LAVÍN SANTIAGO, GRILLI GUIDO, GAVIER-WIDÉN DOLORES, LAVAZZA ANTONIO, CAPUCCI LORENZO Spillover events of infection of brown hares (*Lepus europaeus*) with rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) caused sporadic cases of an European Brown hare syndrome like-disease in Italy and Spain. *Transboundary and Emerging Diseases* Version of Record online: 11 SEP 2016 | DOI: 10.1111/tbed.12562

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.12562/full>