



## **Schneller Nachweis der klassischen Schweinepest mit neuer Zielregion – die neue VIROTYPE® CSFV RT-PCR**

**Gaunitz C, Schroeder C, Labitzke M, Gabert J | LDL – Labor Diagnostik Leipzig**

# Agenda

**Einleitung**

**Testprinzip**

**Durchführung**

**Validierung**

**Zusammenfassung**



# Einleitung

## **Klassische Schweinepest**

**→ international anzeigepflichtige Tierseuche**

Erreger: Classical Swine Fever Virus (CSFV), einzelsträngiges RNA-Virus,  
Genus Pestivirus

Weltweite Verbreitung bei Haus- und Wildschweinen, endemisch bei  
Wildschweinen mehrerer EU-Staaten

**Die Bekämpfung der Klassischen Schweinepest stellt bis heute  
eine große Herausforderung dar.**

# Einleitung

## Probleme

In-house RT-PCR mit 5'-NTR als Target-Region für den panPesti-Virus-Nachweis und den spezifischen Nachweis des CSFV

Risiko: Kreuz-Kontaminationen

Kein standardisierter, zugelassener PCR -Test in Deutschland verfügbar

## Ziel

Entwicklung eines neuen RT-PCR-Systems zum Nachweis des CSF-Virus mit einer neuen Target-Region, die nicht im 5'-NTR-Bereich des Genoms des CSFV liegt.

**→ für größtmögliche Sicherheit in der molekularbiologischen Diagnostik**

# VIROTYPE<sup>®</sup> CSFV



# Testprinzip

Real-time Reverse Transkription  
Polymerase-Kettenreaktion (rRT-PCR)

Single-tube, one-step Verfahren  
→ keine Gefahr von Kreuzkontaminationen

Im Kit enthalten: Alle Reagenzien zum  
Nachweis von CSFV-RNA in einem Tube  
plus Kontrollen



Spezifisches Detektionssystem (TaqMan<sup>®</sup>-Prinzip) für alle bekannten CSF-Viren

Inklusive Extraktions- bzw. Amplifikationskontrolle (Beta-Actin)

Testprotokolle: kurzes Protokoll (1h 47min) und VIROTYPE<sup>®</sup> Protokoll (2h 34 min)

# Durchführung

## Probenmaterial

Serum, Plasma, EDTA-Blut und Gewebeproben

## Testung von Poolproben

### Hausschwein:

20 Serum-, Plasma- bzw. EDTA-Blutproben

10 Gewebeproben

### Wildschwein:

10 Serum-, Plasma- bzw. EDTA-Blutproben

10 Gewebeproben

*Für die Festlegung der Poolgröße sind die Qualität des Probenmaterials und die epidemiologische Situation zu berücksichtigen.*

# Durchführung

## Validierte RNA-Extraktionsverfahren (Auswahl)

QIAamp® Viral RNA Mini (QIAGEN),	Plasma, Serum, EDTA-Blut
QIAamp® MinElute® Virus Spin (QIAGEN)	Plasma, Serum, EDTA-Blut
NucleoSpin® RNA Virus (Macherey & Nagel)	Plasma, Serum, EDTA-Blut
Invisorb Spin Virus RNA Mini Kit (Invitek)	Plasma, Serum, EDTA-Blut
MagMAX Viral RNA Isolation Kit ( Applied Biosystems)	Plasma, Serum
RNeasy® Kit (QIAGEN),	Gewebe
RNeasy® Fibrous Tissue Kit (QIAGEN)	Gewebe
NucleoSpin® RNA II (Machery & Nagel)	Gewebe
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN)	Wildschweinproben

# Durchführung

## Ready-to-use:

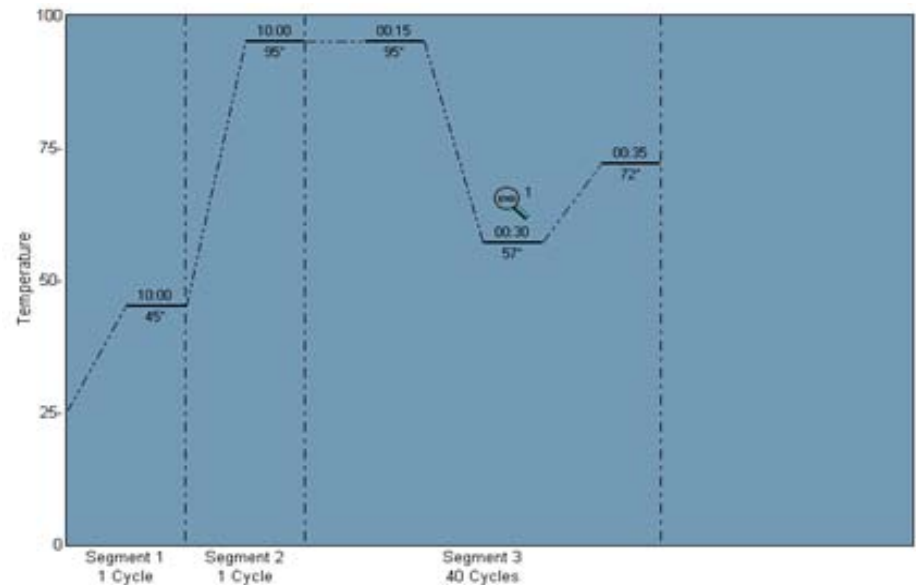
Nur eine Komponente: CSFV-Mix

Kein Ansetzen von  
Reagenzien erforderlich!

## In nur drei Schritten zum Ergebnis:



1. 20 µl CSFV-Mix vorlegen
2. 5 µl Probe oder Kontrolle dazugeben
3. RT-PCR starten



# Validierung

## Analytische Sensitivität

Ermittelt mit Titrationsreihe von CSF in vitro RNA  
( $10^8 - 10^1$  Kopien/Ansatz)

Detektion von bis zu 10 RNA-Kopien /  
Ansatz mit hoher Effizienz

Hohe Sensitivität mit zwei verschiedenen Real-time  
RT-PCR-Programmen möglich:

### Kurzes Protokoll:

45 °C 10 min

95 °C 10 min

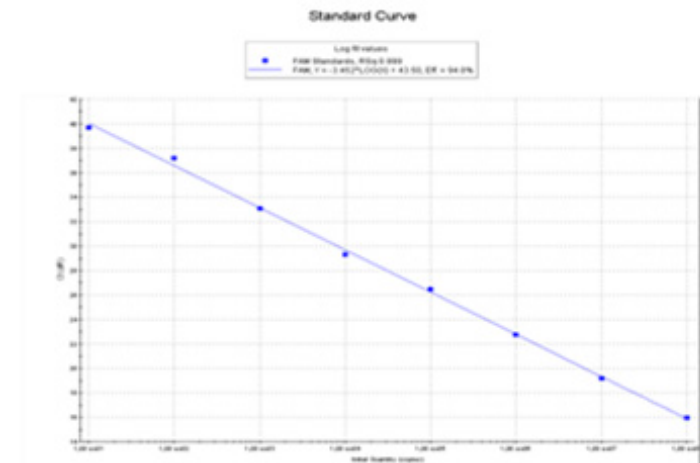
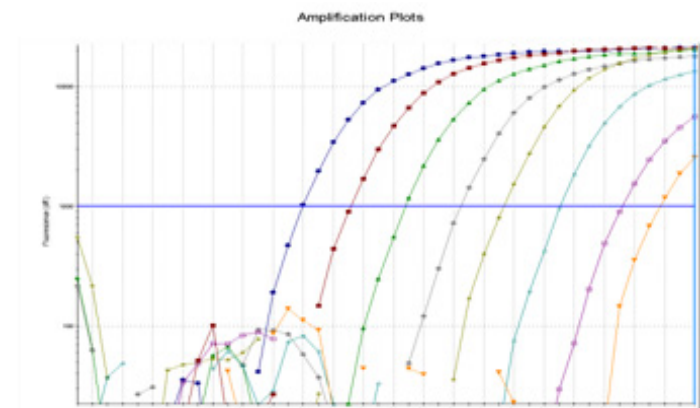
40 Zyklen 95 °C 15 sec, 57 °C 30 sec, 72 °C 35 sec

### Langes VIROTYPE® Protokoll:

50 °C 20 min

95 °C 15 min

42 Zyklen 95°C 30 sec, 57°C 45 sec, 68 °C 45 sec



# Validierung

## Analytische Sensitivität

Testung von Verdünnungsreihen von  
zwei CSFV-Feldstämmen  
(Epizone-Panel, Nr. 36: CSg0864, Nr. 38: CSF0852)  
aus der Viruskultur mit VIROTYPE® CSFV

### Probe 36

Verdünnung bis  $1:10^6$

Effizienz 103,8 %

Korrelationskoeffizient 1,0

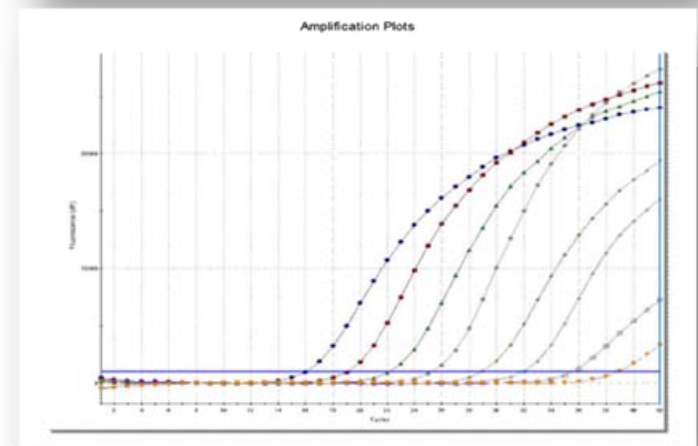
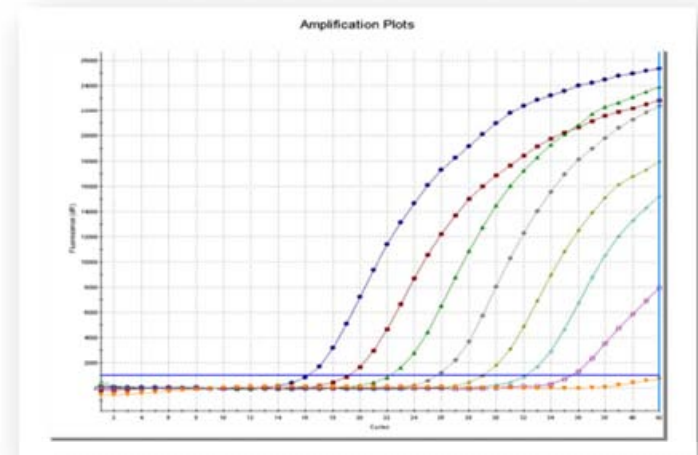
### Probe 38

Verdünnung bis  $1:10^7$

Effizienz 101,5 %

Korrelationskoeffizient 0,999

**Hohe Sensitivität auch mit Feldstämmen**



# Validierung

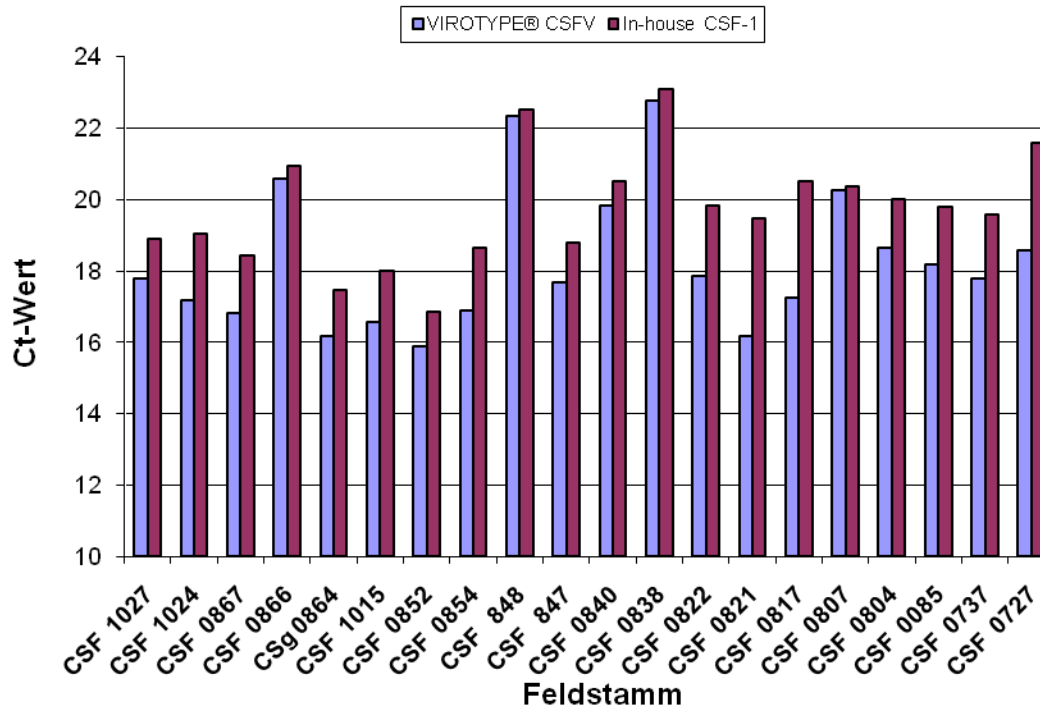
## Testung des EPIZONE Panels - CSFV-Stämme verschiedener europäischer CSFV-Genotypen

Epizone Panel Nr	Stamm	Genotyp	VIROTYPE® C SFV Ct FAM	In-house C SF-1 Ct FAM
1	C strain	1.1	27,45	31,21
2	Eystrup91	1.1	29,94	32,01
3	Alfort187	1.1	28,89	32,03
4	Koslov1128	1.2	27,98	31,64
5	Brescia	1.2	29,35	32,94
6	Schweiz II	2.1	29,34	31,07
7	Pader	2.1	29,66	30,94
8	Bergen	2.2	29,97	34,46
9	D4886/82/Ro	2.2	28,69	30,84
10	Uelzen	2.3	27,16	29,16
11	Spante	2.3	28,42	29,54
12	Congenital Tremor	3.1	25,9	28,85
13	Kanagawa	3.4	27,25	30,65
MW			28,46	31,18
s			1,25	1,53

Alle getesteten Stämme und Genotypen wurden mit dem VIROTYPE® CSFV etwas sensitiver als mit der In-house CSF1-Methode (Hoffmann et al., 2005) detektiert.

# Validierung

Testung von CSFV-Feldstämmen



**Alle CSFV-Feldstämme vom Genotyp 2.3 werden mit VIROTYPE® CSFV sensitiver als mit der In-house-Methode detektiert.**

# Validierung

**Testung von Nicht-CSFV-Pestiviren des Epizone-Panels**  
RNA-Proben der verschiedenen Genotypen verwandter Pestiviren

Pestivirus	Stamm	VIROTYPE <sup>®</sup> CSFV
		Ct FAM
BDV	Moredun	neg
BDV	Rudolph	neg
BDV	Gifhorn	neg
BDV	Isard	neg
BVDV-1	NADL	neg
BVDV-1	Paplitz	neg
BVDV-1	PI809	neg
BVDV-1	NC3807-1251/1	neg
BVDV-1	Egbert	neg
BVDV-1	BO806-17	neg
BVDV-1	BO807-3	neg
BVDV-1	NC3807-8757	neg
BVDV-2	8644	neg
BVDV-2	Bure	neg
BVDV-2	Walter	neg
BVDV-2	PO1600	neg
Pestivirus	Hobi	neg
Pestivirus	Giraffe H138	neg

Es wurden keine  
Kreuzreaktivitäten  
festgestellt.

# Validierung

## Testung von persistent infizierten BVDV-positiven Tieren



Es wurden keine Kreuzreaktivitäten festgestellt.

Probe	VIROTYPE® CSFV	VIROTYPE® BVDV
	Ct FAM	Ct FAM
1	neg	19,81
2	neg	19,35
3	neg	18,72
4	neg	19,89
5	neg	20,27
6	neg	17,36
7	neg	17,83
8	neg	19,82
9	neg	20,55
10	neg	19,72
11	neg	20,38
12	neg	19,12
13	neg	19,84
14	neg	20,89
15	neg	20,51
16	neg	19,54
17	neg	19,56
18	neg	21,69
19	neg	22,66
20	neg	22,55
21	neg	23,6
22	neg	18,76
23	neg	21,03
24	neg	20,98
25	neg	27,49
26	neg	21,29
27	neg	29,46
28	neg	28,04
29	neg	19,96
30	neg	19,53

# Validierung

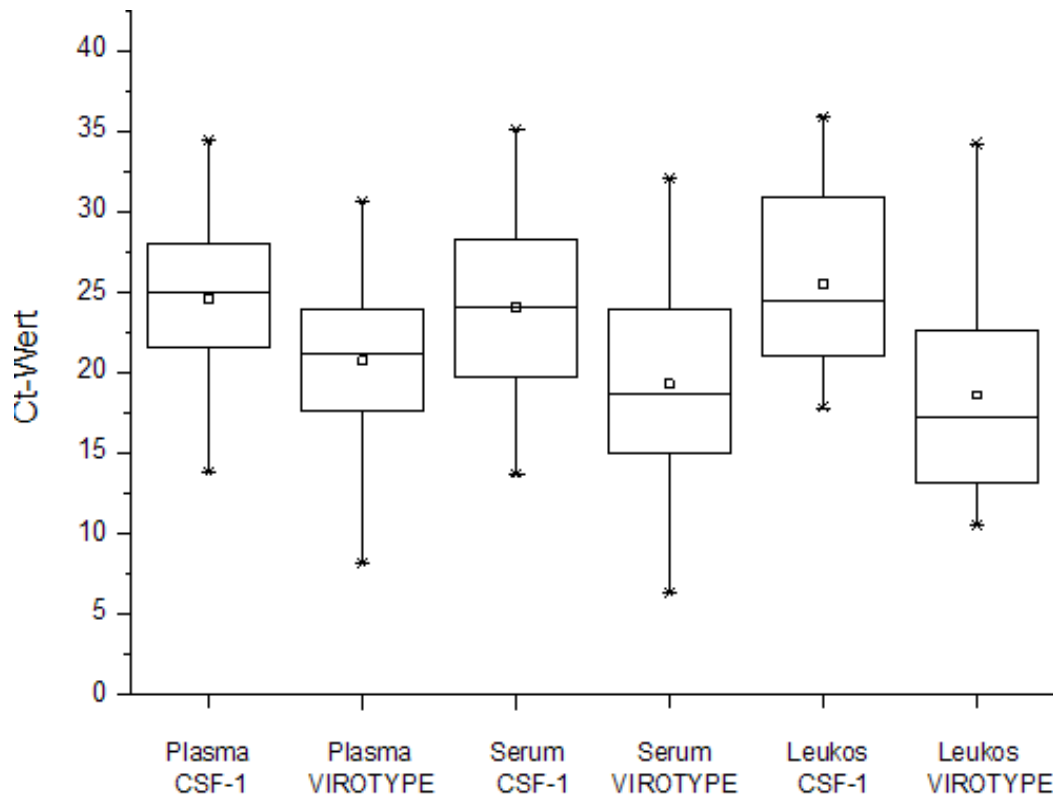
**Testung CSFV-positiver Gewebeproben aus Infektionsversuchen von Schweinen, vom NRL KSP, Insel Riems**

Probe	Anzahl	VIROTYPE® CSFV				In-house CSF-1	
		CSFV-FAM		IC-HEX		CSFV-FAM	
		Ct MW	STD	Ct MW	STD	Ct MW	STD
Milz	23	21,31	5,3	23,96	3,06	23,06	5,25
Niere	23	22,96	5,38	24,93	2,97	24,82	5,17
Tonsillen	23	20,39	6	22,7	2,61	22,19	5,72
Lymphknoten	23	20,77	5,78	22,11	2,33	22,5	5,01

**Hochsensitiver Nachweis von CSFV auch in Gewebeproben mit VIROTYPE® CSFV**

# Validierung

## Testung von 170 RNA-Proben aus Infektionsversuchen von Schweinen vom EU-Referenzlabor für KSP, Hannover



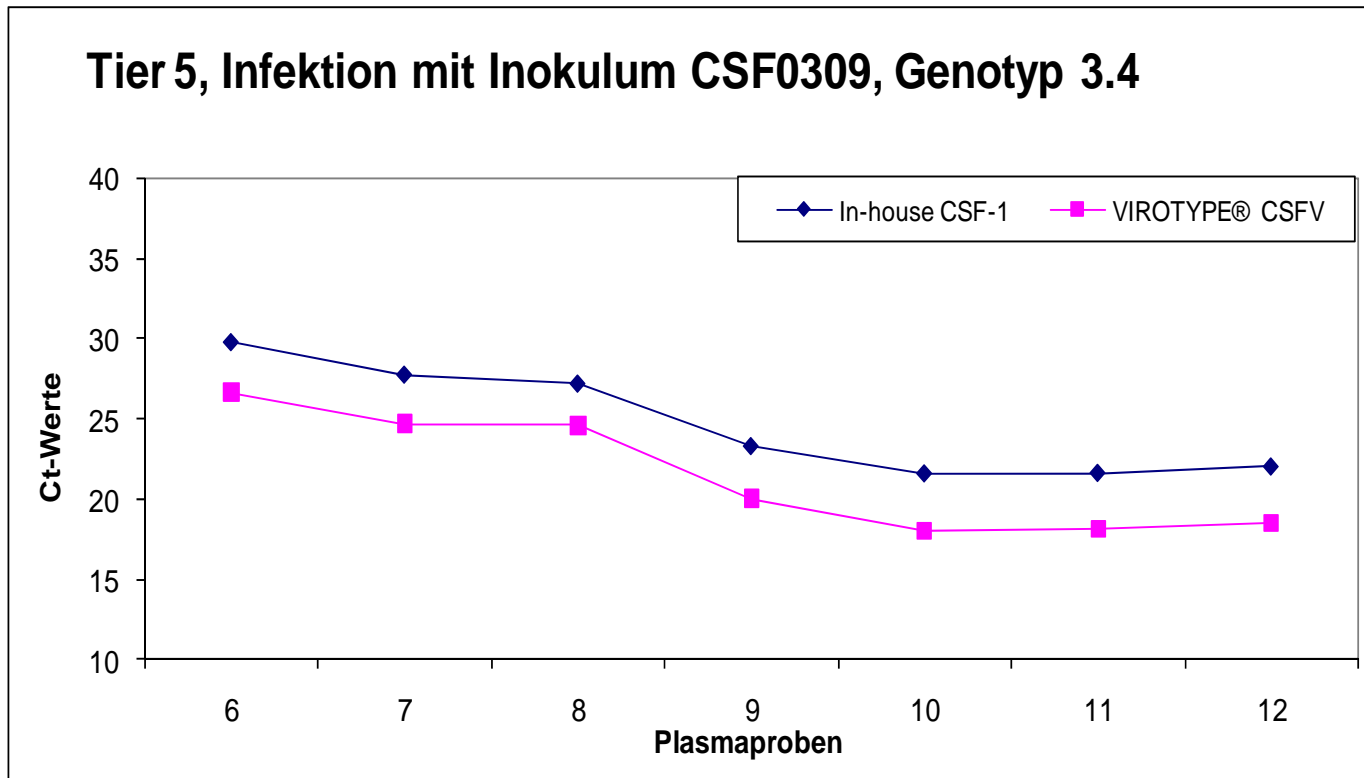
21 verschiedene  
CSFV-Feld-Stämmen  
6 verschiedene  
CSFV-Genotypen

Probenentnahme  
4 bis 24 dpi

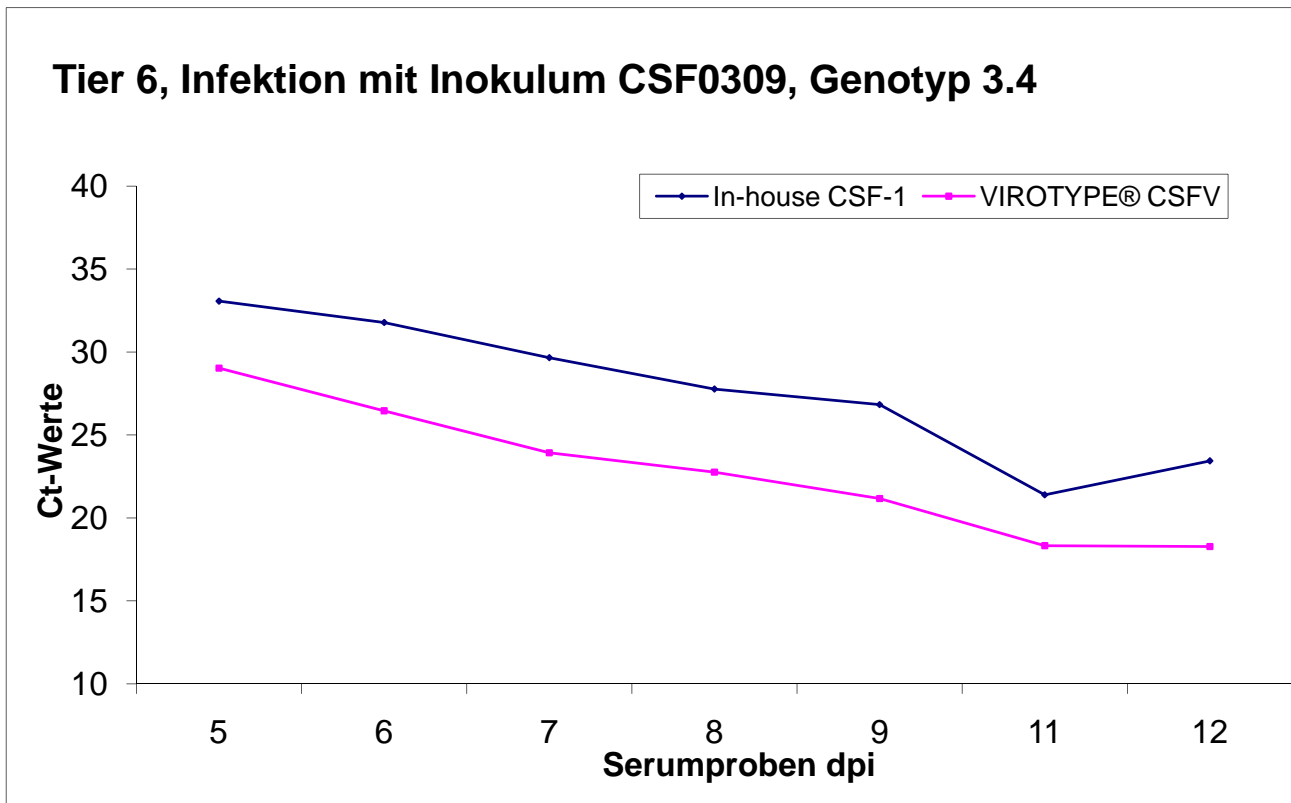
Anzahl der getesteten Proben:  
58 Plasma-Proben  
78 Serum-Proben  
34 Leukozyten-Proben

**Proben aus  
Impfversuchen werden  
mit VIROTYPE® CSFV  
sehr sensitiv detektiert.**

# Validierung



# Validierung



# Validierung

**Testung von Wildschweinproben am Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz**  
Testung der Proben mit In-house CSF1-Methode und VIROTYPE® CSFV

Nr.	Probenart	In-House CSF1		VIROTYPE® CSFV	
		Ct CSFV	CT IC	Ct CSFV	CT IC
1	KSP-Feldvirus	<b>35,48</b>	29,83	<b>34,86</b>	29,16
2	KSP-Feldvirus	<b>36,2</b>	29,29	<b>33,53</b>	28,19
3	KSP-Feldvirus	<b>no ct</b>	29,36	<b>no ct</b>	29,57
4	KSP-Feldvirus	<b>35,44</b>	31,5	<b>38,6</b>	32,88
5	KSP-Feldvirus	<b>21,96</b>	no ct	<b>20,6</b>	no ct
6	KSP-Feldvirus	<b>34,64</b>	28,24	<b>31,59</b>	26,76
7	KSP-Feldvirus	<b>33,99</b>	27,46	<b>33,53</b>	29,59
8	KSP-Feldvirus	<b>36</b>	29,76	<b>35,83</b>	28,63
9	KSP-Feldvirus	<b>27,48</b>	33,22	<b>25,53</b>	31,26
10	KSP-Feldvirus	<b>20,86</b>	no ct	<b>15,94</b>	no ct
11	KSP-Feldvirus	<b>21,68</b>	no ct	<b>17,68</b>	no ct
12	KSP-Feldvirus	<b>21,76</b>	no ct	<b>19,42</b>	no ct
13	KSP-Feldvirus	<b>35,04</b>	32,05	<b>32,24</b>	30,03
14	KSP-Feldvirus	<b>20,28</b>	no ct	<b>16,1</b>	33,74
15	KSP-Feldvirus	<b>29,67</b>	21,57	<b>29,09</b>	23,07
16	KSP-Feldvirus	<b>37,4</b>	33,39	<b>33,95</b>	30,57
17	KSP Impf- u. Feldvirus	<b>37,94</b>	30,48	<b>33,82</b>	31,34
	MW	<b>30,36</b>	29,68	<b>28,27</b>	29,6



**VIROTYPE® CSFV ist  
geeignet zur Testung  
von Wildschweinproben.**

# Validierung

Nr.	Probenart	In-House CSF1		VIROTYPE® CSFV	
		Ct CSFV	CT IC	Ct CSFV	CT IC
18	KSP Impfvirus	<b>31,76</b>	29,65	<b>30,31</b>	33,09
19	KSP Impfvirus	<b>37,77</b>	30,74	<b>no ct</b>	<b>no ct</b>
20	KSP Impfvirus	<b>35,83</b>	31,61	<b>37,15</b>	35,17
21	KSP Impfvirus	<b>35,19</b>	30,69	<b>38,18</b>	36,39
22	KSP Impfvirus	<b>41,09</b>	29,73	<b>no ct</b>	34,57
23	KSP Impfvirus	<b>35,6</b>	27,49	<b>31,17</b>	26,8
24	KSP Impfvirus	<b>37,91</b>	32,63	<b>32,4</b>	32,4
25	KSP Impfvirus	<b>35,45</b>	29,57	<b>32,51</b>	30,81
26	KSP Impfvirus	<b>35,62</b>	30,48	<b>30,97</b>	30,05
27	KSP Impfvirus	<b>34,96</b>	27,98	<b>28,38</b>	26,36
28	KSP Impfvirus??	<b>36,05</b>	30,54	<b>37,65</b>	32,4
29	KSP Impfvirus	<b>38,65</b>	27,02	<b>33,37</b>	26,02
30	KSP Impfvirus	<b>34,9</b>	27,67	<b>30,21</b>	26,8
31	KSP Impfvirus	<b>31,2</b>	28,88	<b>28,47</b>	30,02
	MW	<b>35,86</b>	29,62	<b>32,56</b>	30,84

**VIROTYPE® CSFV detektiert auch Proben von geimpften Wildschweinen**

Einzel-PCR	In-house CSF1	Pool	VIROTYPE® CSFV	
CT CSFV	CT IC		Ct CSFV	CT IC
31,76	29,65	5 er Pool	34,58	27,16
37,91	32,63	5 er Pool	38,85	28,51
34,64	28,24	5 er Pool	36,19	29,18
21,68	no ct	5 er Pool	27,48	30,36
31,76	29,65	10 er Pool	34,08	30,1
37,91	32,63	10 er Pool	34,77	28,1
34,64	28,24	10 er Pool	35,06	26,8
21,68	no ct	10 er Pool	21,23	28,12
31,50	30,17	<b>MW</b>	32,78	28,54

**Wildschweinproben können als Pool-Proben getestet werden**

# Zusammenfassung

## **VIROTYPE<sup>®</sup> CSFV von LDL – Labor Diagnostik Leipzig**

- ✓ Standardisierter und hochempfindlicher Test
- ✓ Sehr einfache Testdurchführung
- ✓ Sensitivität gleich oder besser als In-house-RT-PCR nach Hoffmann et al, 2005
- ✓ Kostengünstig durch Testen von Poolproben
- ✓ Geeignet für Hochdurchsatz

# Herzlichen Dank...

Dr. Bernd Hoffmann, Immanuel Leifer und PD DR. Martin Beer



Gefördert mit Mitteln der  
Sächsischen AufbauBank,  
Fördernummer 11272



**SAB**  
Sächsische AufbauBank

**NRL KSP** | Dr. Sandra Blome

**EU Community Reference Laboratory for CSF** | Stefanie Schmeiser

**Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz** | Dr. Karl Zimmer & Dr. Irene Klingelhöfer

Für unseren Produktionsstandort in Dresden suchen wir ab sofort einen/eine: Biologielaborant/in, VMTA, BTA, MTA. [\[mehr\]](#)

Testen Sie CATTLETYPE® MAP Ab! Anwenderfreundlicher ELISA Kit mit einer Serumverdünnung von 1:20! 24 Monate haltbar. [\[mehr\]](#)



Weltweit aktiv!  
LDL – Labor Diagnostik  
Leipzig [\[mehr\]](#)

[Startseite](#)

[Produkte](#)

[Support](#)

[Unternehmen](#)

Suchbegriff

[Finden](#)

## VIROTYPE® CSFV

Neu, zugelassen und  
sofort erhältlich!

Real-time RT-PCR Testkit für den  
sicheren Nachweis des Virus der  
Klassischen Schweinepest.

[\[mehr Infos\]](#)



### Von Deutschland in die Welt

Aus unseren zertifizierten Laboren in Sachsen versenden wir Testkits an jede Adresse – zuverlässig, auch wenn es schnell gehen muss. Kompetente Antworten liefert unser Support.

[\[mehr Infos\]](#)



### Alle Produkte im Blick

Unser Produktsortiment umfasst Diagnostika für Wiederkäuer, Geflügel, Schweine, Pferde sowie Reagenzien und Schnelltests.

[\[mehr Infos\]](#)



### Mehr Wissen: Downloads

Stets auf dem neuesten Stand! Unser Support hält Produktblätter, Infografiken, wissenschaftliche Präsentationen und Beiträge sowie aktuelle Software inklusive Updates bereit.

[\[mehr Infos\]](#)



## **Schneller Nachweis der klassischen Schweinepest mit neuer Zielregion – die neue VIROTYPE® CSFV RT-PCR**