



VIROTYPE[®] CSFV

Gebrauchsinformation

Real-time RT-PCR Testkit zum Nachweis des Virus der Klassischen Schweinepest

in vitro-Diagnostikum für Schweine

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17c TierSG zugelassen.

Zulassungs-Nr.: FLI-B 517

VIROTYPE [®] CSFV	25 Reaktionen	Artikelnummer	05-201/25
VIROTYPE [®] CSFV	96 Reaktionen	Artikelnummer	05-201/96
VIROTYPE [®] CSFV	480 Reaktionen	Artikelnummer	05-201/480

Verwendungszweck

Die Produktgruppe VIROTYPE[®] umfasst Testsysteme zum Nachweis von pathogenen Viren mittels real-time PCR. VIROTYPE[®] CSFV dient zum Nachweis des Erregers der Klassischen Schweinepest mittels real-time RT-PCR in Serum, Plasma, EDTA-Blut und Gewebeproben (Einzel- oder Poolproben) von Schweinen.

Herstellung & Support:

LDL - Labor Diagnostik GmbH Leipzig
 Deutscher Platz 5b | 04103 Leipzig | Germany
 Phone +49 (0)341/12454 0 | Fax +49 (0)341/12454 60
 info@lab-leipzig.de | www.lab-leipzig.de



Allgemeine Informationen

Die Klassische Schweinepest (engl. Classical Swine Fever) ist wirtschaftlich gesehen eine der wichtigsten viralen Infektionskrankheiten des Schweins. Sie ist bei Haus- und Wildschweinen weit verbreitet. Die Klassische Schweinepest ist eine international anzeigepflichtige Tierseuche. Der Erreger, das Classical Swine Fever Virus (CSFV), ist ein einzelsträngiges RNA-Virus, das zum Genus Pestivirus innerhalb der Familie Flaviviridae gehört, wie das Bovine Virusdiarrhoe-Virus beim Rind und das Border Disease Virus beim Schaf.

Durch seine hohe Sensitivität ermöglicht VIROTYPE® CSFV den sicheren und frühzeitigen Nachweis des Erregers sowohl in Blutproben (Einzel- und Poolproben) als auch in Gewebeproben (Einzel- und Poolproben). VIROTYPE® CSFV weist alle bekannten CSFV-Stämme nach. In seltenen Fällen ist der Nachweis des CSF-Impfvirus mit dem Testkit möglich. Deshalb sollten positive Ergebnisse bei Tieren aus Impfgebieten abgeklärt werden.

Beschreibung des Testprinzips

VIROTYPE® CSFV enthält alle Reagenzien zum Nachweis von RNA des CSF-Virus sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle.

Die Reverse Transkription (RT) der RNA und die anschließende Amplifikation der cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen in einem Ansatz, so dass die Gefahr von Kontaminationen minimiert ist. Die Reporter der Sonden emittieren Fluoreszenz proportional zur Menge des gebildeten Amplifikats, dadurch kann die Reaktion in Echtzeit verfolgt werden (real-time PCR).

VIROTYPE® CSFV verwendet eine Primer-Sonden-Kombination spezifisch für die CSFV-RNA (FAM-Fluoreszenz) sowie eine Primer-Sonden-Kombination spezifisch für die Kontroll-RNA (interne Kontrolle, HEX-Fluoreszenz). Als interne Kontrolle des Tests wird mRNA des β -Actin Housekeeping Gens amplifiziert, die in jeder Blut- und Gewebeprobe enthalten ist. Damit ist eine Kontrolle sowohl der Extraktion als auch der Amplifikation gewährleistet.

Inhalt	25 Reaktionen	96 Reaktionen	480 Reaktionen
CSFV-Mix (orange Verschlusskappe) inkl. Primer, Sonden und Enzyme	520 μ l	2 x 980 μ l	6 x 1,625 ml
Positivkontrolle (rote Verschlusskappe)	25 μ l	70 μ l	2 x 50 μ l
Negativkontrolle (blaue Verschlusskappe)	25 μ l	70 μ l	2 x 50 μ l

Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien sind nach Erhalt sofort bei -20 °C lichtgeschützt zu lagern. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Testkit bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Verpackungsetikett) haltbar. Abgelaufene Testkits dürfen nicht mehr benutzt werden.

CSFV-Mix und Positivkontrolle dürfen nicht häufiger als dreimal aufgetaut werden und sollten vor noch häufigerem Gebrauch aliquotiert werden.

Zusätzlich benötigte Materialien

- RNA-Extraktionskit
- Pipetten (0,5 µl – 1000 µl)
- Sterile, Aerosol-resistente Filterspitzen
- Sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Tischzentrifuge
- Optische Reaktionsplatte, 96 Kavitäten bzw. optische Reaktionsröhrchen
- Optische Abdeckfolie oder entsprechende Deckel
- Real-time PCR Gerät: z. B. Mx3000P, Mx3005P (Stratagene/ Agilent), ABI PRISM 7000, 7500 (Applied Biosystems), CFX96 System (BioRad) und vergleichbare Geräte

Warenzeichen und Patente

VIROTYPE® ist ein eingetragenes Warenzeichen.

Die PCR ist patentrechtlich geschützt. Der Kauf dieses Produktes berechtigt den Käufer zur Verwendung dieses Produkts zur Durchführung von veterinärmedizinischen in vitro Tests unter bestimmten Roche-Patenten. Eine allgemeine Patent- oder sonstige Lizenz, welche über vorgenanntes Nutzungsrecht des Käufers dieses Produkts hinausgeht, wird nicht gewährt.

Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Den Test sollten nur für Labortätigkeit qualifizierte und speziell geschulte Personen ausführen. Die Bestandteile des Testkits dürfen nicht verunreinigt und nicht mit Bestandteilen aus anderen Chargen vermischt werden. Probenvorbereitung und Amplifikation sollten in getrennten Räumlichkeiten stattfinden. Beachten Sie die Sicherheitsbestimmungen für das Arbeiten in Laboratorien und halten Sie die Regeln der Good Laboratory Practice (GLP) ein. Bitte tragen Sie Handschuhe. Alle Reste von Proben und mit Proben in Berührung gekommene Gegenstände sind als potenziell infektiöse Materialien zu dekontaminieren bzw. zu entsorgen.

**Die Einhaltung des vorgeschriebenen Protokolls ist unbedingt erforderlich.
Nur für den tierärztlichen Gebrauch!**

Probenmaterial

VIROTYPE® CSFV ist geeignet zum Nachweis von CSFV-RNA aus Serum, Plasma, EDTA-Blut und Gewebeproben von Schweinen. Aufgrund der hohen Sensitivität des Testkits können Einzel- und Poolproben getestet werden. In der Regel können bei Hausschweinen bis zu 20 Serum-, Plasma- bzw. EDTA-Blutproben oder bis zu 10 Gewebeproben gepoolt werden. Bei Wildschweinen können bis zu 10 Serum-, Plasma- bzw. EDTA-Blutproben oder bis zu 10 Gewebeproben gepoolt werden. Für die Festlegung der Poolgröße sind die Qualität des Probenmaterials und die epidemiologische Situation zu berücksichtigen.

RNA-Extraktion

Für die Extraktion von CSFV-RNA können u.a. folgende Kitsysteme verwendet werden:

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)	Gewebeproben
RNeasy® Fibrous Tissue Kit (QIAGEN)	Gewebeproben
NucleoSpin® RNA II (Machery & Nagel)	Gewebeproben
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN)	Wildschweinproben
oder vergleichbare, validierte Systeme	

Falls die real-time RT-PCR nicht sofort im Anschluss an die RNA-Extraktion durchgeführt wird, sind die RNA-Isolate bei -20 °C oder besser bei -70 °C zu lagern.

CSFV real-time RT-PCR Protokoll

Bitte lesen Sie das gesamte Protokoll, bevor Sie mit der Testdurchführung beginnen. Da RNA-Moleküle sehr instabil sind, wird eine zügige Arbeitsweise empfohlen.

Alle Reagenzien vor der Verwendung bei Raumtemperatur (18-25 °C) lichtgeschützt auftauen lassen, mischen und kurz an zentrifugieren; Pipettierschritte auf Eis ausführen.

Planen Sie die Anzahl der durchzuführenden Reaktionen (Anzahl der Proben + Kontrollen) zzgl. einer Reserve. In jedem Lauf sollte eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

1. Den CSFV-Mix (orange Verschlusskappe) mischen, kurz an zentrifugieren, die benötigte Gesamtmenge entnehmen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführen.

Den nicht benötigten CSFV-Mix sofort wieder bei -20 °C im Dunkeln lagern.

2. 20 µl des CSFV-Mix pro Ansatz in jeweils eine Kavität einer optischen PCR-Platte bzw. in optische PCR-Röhrchen übertragen.
3. 5 µl der RNA-Probe bzw. der Kontrollen (rote bzw. blaue Verschlusskappe) zupipettieren und mischen. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes beträgt somit 25 µl.
4. Verschließen der PCR-Gefäße mit optischer Abdeckfolie oder Deckel, ggf. an zentrifugieren.

In der Geräte-Software bitte folgende Einstellungen für Reporter und Quencher verwenden:

	Reporter	Quencher
CSFV	FAM	TAMRA
Interne Kontrolle	HEX/JOE ¹	TAMRA
Passive Referenz ²	ROX	

1 abhängig von der möglichen Einstellung am jeweiligen Gerät

2 interne Referenz bei Verwendung von ABI PRISM® Sequence Detection Systems

Real-time RT-PCR-Programm:

45 °C	10 min	
95 °C	10 min	
95 °C	15 sec	40 Zyklen
57 °C	30 sec	Messung am Ende dieses Schrittes
72 °C	35 sec	

(Gesamtdauer mit Stratagene Mx3000P: 1 h 47 min)

Alternativ können bei Verwendung des VIROTYPE®-Programms gleichzeitig Testungen weiterer VIROTYPE® Produkte (VIROTYPE® BTV Plus, VIROTYPE® BVDV und VIROTYPE® Influenza A) in einem Gerät durchgeführt werden:

50 °C	20 min	
95 °C	15 min	
95 °C	30 sec	40 Zyklen
57 °C	45 sec	Messung am Ende dieses Schrittes
68 °C	45 sec	

(Gesamtdauer mit Stratagene Mx3000P: 2 h 29 min)

Testvalidierung

Für eine gültige Messung sollen das FAM- und das HEX-Signal der Positivkontrolle einen Ct-Wert kleiner als 35 ($Ct < 35$) ergeben. Die Negativkontrolle weist weder ein FAM- noch ein HEX-Signal auf.

Interpretation der Ergebnisse

A. Ein FAM-Fluoreszenzsignal wird detektiert:

→ Das Ergebnis ist positiv, die Probe enthält CSFV-RNA.

Die Detektion eines HEX-Fluoreszenzsignales ist in diesem Falle nicht zwingend notwendig, da hohe Ausgangskonzentrationen an CSFV-RNA durch Konkurrenz zu einem reduzierten bzw. ausbleibenden Signal für die interne Kontrolle führen können.

B. Es wird kein FAM-Fluoreszenzsignal, jedoch ein HEX-Fluoreszenzsignal (interne Kontrolle) detektiert:

→ Das Ergebnis ist negativ, die Probe enthält keine CSFV-RNA.

Die Detektion des HEX-Fluoreszenzsignales für die interne Kontrolle schließt die Möglichkeit einer vollständigen PCR-Inhibition oder fehlerhaften Extraktion aus. Ist der erhaltene Ct-Wert der internen Kontrolle jedoch größer als 35 ($Ct > 35$), so liegt möglicherweise ein teilweise inhibierter Pool oder Einzelprobe vor. Die jeweiligen Einzelproben sollten dann verdünnt (z. B. 1:5) in Nuklease-freiem Wasser nachgetestet werden.

C. Weder ein FAM-Fluoreszenzsignal noch ein HEX-Fluoreszenzsignal werden detektiert:

→ Der Test ist ungültig, eine diagnostische Aussage ist nicht möglich.

Es erfolgte eine PCR-Inhibition oder fehlerhafte Extraktion. Es wird empfohlen, die jeweiligen Einzelproben verdünnt (z. B. 1:5) in Nuklease-freiem Wasser nachzutesten oder die RNA-Extraktion aus der Probe bzw. den Test mit frischem Probenmaterial zu wiederholen.

Notizen.....