

GEBRAUCHSINFORMATION



ingenetix GmbH

Arsenalstraße 11, 1030 Wien, Österreich, T +43 (0)1 361980198,
F +43 (0)1 361980199, office@ingenetix.com, www.ingenetix.com

ViroReal[®] Kit ASF Virus

REF DVEV02013 Σ 100

REF DVEV02053 Σ 50



Wirksame Bestandteile

Beschriftung	Inhalt	Menge	
		DVEV02013	DVEV02053
ASFV Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonde (FAM) für ASF Virus Detektion	2 x 50 µl	1 x 50 µl
DNA IPC-3 Assay Mix (gelber Verschluss)	Primer und Sonde (Cy5) für IPC Detektion	2 x 50 µl	1 x 50 µl
DNA IPC Target (oranger Verschluss)	DNA Interne Positivkontrolle	1 x 100 µl	1 x 100 µl
ASFV DNA Positiv Kontrolle (roter Verschluss)	DNA Positivkontrolle (ca. 10.000 Targetkopien/µl)	1 x 25 µl	1 x 25 µl
DNA Reaktions Mix (weißer Verschluss)	DNA Reaktions Mix	2 x 500 µl	1 x 500 µl
Nuklease-freies Wasser (blauer Verschluss)	H ₂ O	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

In-vitro-Diagnostikum

1. Anwendungszweck

Das Anwendungsgebiet für ViroReal® Kit ASF Virus ist der Nachweis des Virus der Afrikanischen Schweinepest (engl. African Swine Fever Virus) in Blut, Lunge, Lymphknoten, Milz oder Serum von Schweinen und Wildschweinen unter Verwendung von real-time PCR. Der Test wurde für derzeit in Europa zirkulierende Viren entwickelt. Es ist möglich, dass die Genotypen IX (Uganda), X (Tansania und Kenia) und XXIII (Ostafrika, Äthiopien, Demokratische Republik Kongo), sowie bislang unbekannte Genotypen, mit diesem Test nur schwach oder nicht nachgewiesen werden können.

2. Arbeitsanweisung

2.1. Prinzip der real-time PCR

Bei der Detektion von Pathogenen mittels real-time PCR wird ein spezifischer DNA-Abschnitt aus dem Erregergenom erkannt und amplifiziert. Das erzeugte PCR-Produkt wird mit Hilfe einer Oligonukleotid-Sonde detektiert, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Diese Technologie ermöglicht den sequenzspezifischen Nachweis von PCR-Amplifikaten.

Das ViroReal® Kit ASF Virus wurde für Applied Biosystems® 7500 System (Thermo Fisher Scientific), entwickelt, eignet sich aber auch für andere real-time PCR-Geräte, wie LightCycler® 480 (Roche) und Mx3005P® (Agilent).

2.2. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- In *in vitro*-Diagnostikum: Dieses Produkt sollte nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose Verfahren geschult wurde.
- Ein Zusammenführen von mehr als 5 Proben wird nicht empfohlen, da es zu falsch-negativen Ergebnissen führen könnte.
- Labortische und Hilfsmittel müssen regelmäßig gereinigt werden.
- Die Verwendung von sterilen aerosol-resistenten Pipettenspitzen und puderfreien Einweghandschuhen ist erforderlich.
- Separat getrennte Arbeitsbereiche sind für die Aufbereitung des Probenmaterials, Vorbereitung der real-time PCR und Amplifikation zu verwenden. Die Geräte und Materialien müssen diesen Arbeitsbereichen zugeordnet sein. Der Arbeitsablauf muss von Prä- zu Post-PCR im Labor verlaufen.
- Beim Hantieren mit den Proben und der Positivkontrolle ist Vorsicht geboten, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Nach der Verwendung der Proben und der Positivkontrolle sollten die Handschuhe gewechselt werden.
- Die Lagerung von positivem und potentiell positivem Material sollte separat von allen anderen Reagenzien erfolgen.
- Die Qualität der DNA hat großen Einfluss auf die Testperformance. Es muss sichergestellt sein, dass das verwendete DNA-Extraktionssystem mit real-time PCR-Technologie kompatibel ist.
- Kontaminationen von Geräten und Materialien mit DNA/RNA, Nukleasen oder Amplifikationsprodukten sind durch gute Laborpraxis zu vermeiden.
- Komponenten sollten vor Licht geschützt werden und wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden.
- Für eine zulässige Interpretation der Ergebnisse sollte eine Negativkontrolle während der DNA-Extraktion (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial) mit einbezogen werden, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kontamination mit Erreger-DNA während der Extraktion ausschließen zu können.
- Probenmaterial, Reagenzien und Abfall sollten gemäß lokalen Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen sollten nicht vermischt werden.
- Bitte beachten Sie das Ablaufdatum des Kits.
- **Vorsicht:** Das DNA-IPC-Target wird in Stabilizer aufbewahrt, welcher Guanidinthiocyanat/Triton X-100 enthält (siehe MSDS, www.ingenetix.com).

2.3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Reagenzien und Laborgeräte für DNA-Extraktion
- Nuklease-freies Wasser
- Puderfreie Laborhandschuhe
- Pipetten (einstellbar)
- Sterile Filterpipettenspitzen
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße
- Real-time PCR Gerät, welches Fluoreszenz im FAM und Cy5 Kanal messen und differenzieren kann
- Optische 96 Well Reaktionsplatten oder Reaktionsgefäße

2.4. Vorbereitung der real-time PCR

Bitte beachten Sie, dass pro PCR-Lauf mindestens eine Negativkontrolle (10 µl Nuklease-freies Wasser, blauer Verschluss) als auch eine Positivkontrolle (ASF Virus Positiv Kontrolle, roter Verschluss) und eine Extraktions-Negativkontrolle (optional, empfohlen) mitgeführt werden. Ingenetix empfiehlt die PCR Analysen im Doppelansatz durchzuführen, da dadurch die Wahrscheinlichkeit des Pathogen Nachweises erhöht und die Interpretation der Ergebnisse erleichtert wird.

DNA Interne Positivkontrolle:

Extrahieren Sie die Probe mit einem DNA Extraktionssystem, das mit real-time PCR Technologie kompatibel ist. Es sollte immer eine Negativkontrolle der DNA-Extraktion mitgeführt werden (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial).

Das **DNA IPC Target** wird während der Extraktion zugesetzt. Die DNA IPC dient der Kontrolle der Extraktion, identifiziert mögliche PCR Inhibierungen und überprüft die Integrität der Kit Reagenzien. **Achtung:** Das unverdünnte DNA IPC Target darf nicht direkt zum Probenmaterial pipettiert werden, sondern muss zum Lysepuffer zugegeben werden.

→ Bei Elutionsvolumen von 50-100 µl: Pro Probe Zugabe von 1 µl DNA IPC Target zum Lysepuffer.

→ Bei Elutionsvolumen >100 µl oder bei Gebrauch eines automatischen Extraktionssystems: Pro Probe, Zugabe von 2 µl DNA IPC Target zum Lysepuffer.

Positivkontrolle:

Die ASFV DNA Positiv Kontrolle ist eine Plasmid DNA, die auf -20°C gelagert werden muss.

→ Für die Positivkontrolle wird 1 µl ASFV DNA Positiv Kontrolle + 4 µl Wasser eingesetzt.

2.5. Pipettierschema

		Pro Probe
Ansetzen des Master Mixes (gut durchmischen)	Nuklease-freies Wasser*	3,0 µl
	DNA Reaktions Mix	10,0 µl
	ASFV Assay Mix	1,0 µl
	DNA IPC-3 Assay Mix	1,0 µl
	Gesamtvolumen Master Mix	15,0 µl
Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	15,0 µl
	DNA-Probe*	5,0 µl
	Gesamtvolumen	20,0 µl

*Von der Probe können 1-8 µl eingesetzt werden. Bei einem Volumen von ≠ 5 µl Probe muss das H₂O-Volumen entsprechend angepasst werden.

→ **Falls das DNA IPC Target nicht während der Extraktion zugegeben wurde:** Verdünnen Sie das DNA IPC Target frisch 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser und geben Sie 1 µl pro Probe direkt zum Master Mix zu.

Achtung: Bei Verwendung von mehr als 1 µl 1:100 verdünntem DNA IPC Target pro Reaktion wird die real-time PCR Reaktion inhibiert.

2.6. Programmierung des Temperaturprofils

Informationen zur Programmierung der PCR-Geräte finden Sie im jeweiligen Benutzerhandbuch des Herstellers.

Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen vor der Verwendung einer Multiplex-PCR mit den jeweiligen Farbstoffen kalibriert werden müssen.

Auswahl der Detektionskanäle: FAM-TAMRA, 530 nm (ASFV)
Cy5-NONE, 667 nm (IPC-3)

Auswahl des Referenzfarbstoffes: ROX

Probenvolumen: 20 µl

Temperaturprofil:

Program 1	Program 2	Program 3
Cycles: 1 Analysis: None	Cycles: 1 Analysis: None	Cycles: 45 Analysis: Quantification Acquisition at 60°C
50°C	95°C 20 sec	95°C 5 sec
*2 min		60°C 1 min

Für Applied Biosystems® 7500:
Ramp speed: "Standard"

Für LightCycler® 480 instrument:
Detection format: 2 Color Hydrolysis Probe

2.7. Interpretation der PCR-Daten

Beispiele für die Interpretation von positiven Reaktionen sind in den unten angeführten Abbildungen dargestellt.

Folgende Kriterien müssen für eine gültige Interpretation erfüllt sein:

	FAM Kanal ASFV Target	Cy5 Kanal IPC Target	Interpretation
Negativkontrolle	negativ	negativ / positiv ¹	valid
Positivkontrolle unverdünnt, 1 µl/PCR)	positiv	negativ / positiv ¹	valid
Extraktions-Negativkontrolle (optional)	negativ	positiv	valid
Negative Probe	negativ	positiv	negativ ²
Positive Probe	positiv	positiv / negativ ³	positiv

¹Nur positiv, wenn 1:100 frisch verdünntes DNA IPC Target direkt zum Mastermix zugegeben wurde.

²Das positive Signal der DNA IPC schließt eine mögliche PCR Inhibition aus. Die IPC Ct-Werte sollten jedoch vergleichbare Ergebnisse zeigen. Eine Verschiebung der Ct-Werte kann auf eine partielle Inhibition hindeuten.

³Eine hohe Viruskonzentration in der Probe kann zu einem reduzierten oder negativen Signal der DNA IPC führen.

Analyse der PCR-Daten:

Für die Analyse von PCR-Ergebnissen, die mit dem ViroReal® Kit ASF Virus erhalten wurden, die Fluoreszenzdarstellungs-Optionen 530 nm (FAM-Kanal) für das ASF Virus Target und den Cy5 Kanal für das DNA IPC Target auswählen. Proben mit einem positiven Ct oder Cp-Wert im FAM-Kanal werden positiv gewertet. Bitte überprüfen Sie die Amplifikationskurven auch mit einem manuell gesetzten Threshold.

Nach Abschluss der Analyse sind folgende Ergebnisse möglich:

1. Signal im FAM Kanal:

→ DNA des Virus der Afrikanischen Schweinepest wurde amplifiziert. Die Probe muss „positiv“ interpretiert werden. Anwesenheit von DNA des Virus der Afrikanischen Schweinepest kann zu reduziertem oder fehlendem Fluoreszenzsignal bei der Internen Positivkontrolle führen (PCR Konkurrenz).

2. Kein Signal im FAM Kanal, jedoch Signal der Internen Positivkontrolle (DNA IPC Target):

→ In der Probe ist keine DNA des Virus der Afrikanischen Schweinepest nachweisbar. Die Probe muss “negativ” interpretiert werden.

Das positive Signal der Internen Positivkontrolle schließt eine mögliche PCR-Inhibierung aus.

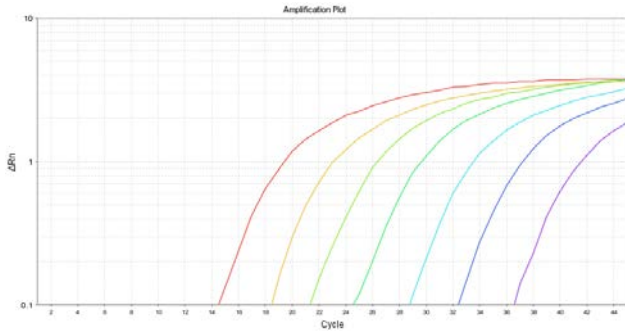
3. Kein Signal im FAM Kanal und kein Signal der Internen Positivkontrolle:

→ Es kann keine Aussage gemacht werden.

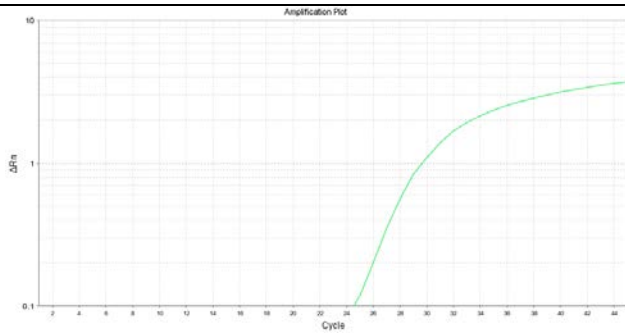
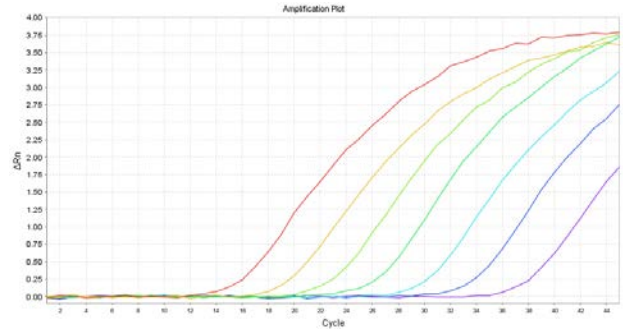
Hinweise bezüglich möglicher Fehlerquellen und deren Beseitigung sind unter Punkt 2.8. Troubleshooting angeführt.

Logarithmische Darstellung

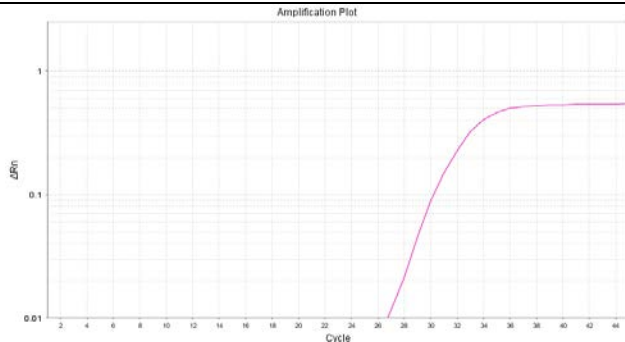
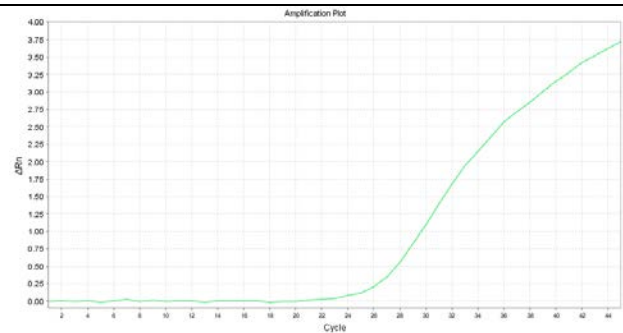
Lineare Darstellung



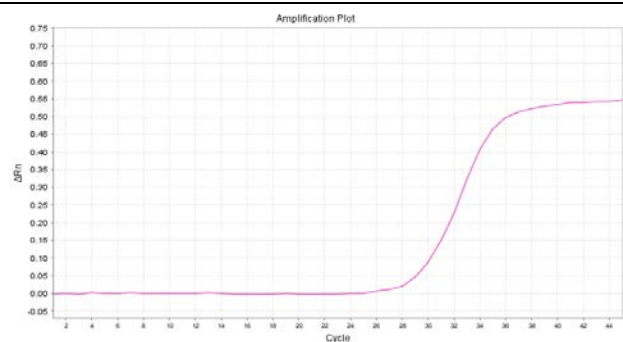
Applied Biosystems® 7500: FAM Kanal, 530 nm
1:10 serielle Verdünnung der ASFV DNA



Applied Biosystems® 7500: FAM Kanal, 530 nm
ASFV DNA Positivkontrolle



Applied Biosystems® 7500: Cy5 Kanal, 667 nm
DNA Interne Positivkontrolle



2.8. Troubleshooting

2.8.1. Kein ASF Virus-spezifisches Signal mit der Positivkontrolle:

- Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils am real-time PCR Instrument.
→ Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Angaben im Protokoll (siehe Punkt 2.4. Vorbereitung der real-time PCR).
- Fehler in der Zusammensetzung der PCR-Reaktion.
→ Überprüfen Sie die Pipettierschritte an Hand des Schemas (siehe Punkt 2.4. Vorbereitung der real-time PCR) und, falls nötig, wiederholen Sie die PCR.

2.8.2. ASF virus-spezifisches Signal mit der Negativkontrolle:

- Es kam zu einer Kontamination während des Ansetzens der PCR.
→ Wiederholen Sie die PCR in Mehrfachansätzen mit neuen Reagenzien.
→ Pipettieren Sie die Positivkontrollen immer zuletzt.
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

2.8.3. ASF virus-spezifisches Signal mit der Negativkontrolle der DNA-Extraktion (optional):

- Während der Extraktion kam es zu einer Kontamination.
→ Wiederholen Sie die DNA-Extraktion und PCR mit neuen Reagenzien.
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

2.8.4. Kein ASF virus-spezifisches Signal im FAM Kanal und kein Signal der Internen Positivkontrolle:

- Es kam zu einer PCR Inhibierung. Es kann keine Aussage gemacht werden.
→ Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete DNA-Extraktionsmethode verwenden und die Vorgaben des Herstellers einhalten.
→ Sollte kein operativer Fehler gefunden werden, wird empfohlen die PCR mit weniger DNA-Eluat zu wiederholen (1/5 oder 1/10 des Probenvolumens + adäquate Menge H₂O).
- Falsche PCR-Bedingungen.
→ Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Angaben im Protokoll (siehe Punkt 2.4. Vorbereitung der real-time PCR) und folgen Sie genau den Herstelleranweisungen Ihres real-time PCR Instruments.
- Falsche Einstellung der Detektionskanäle.
→ Überprüfen Sie die richtige Einstellung der Detektoren für den Virusnachweis (FAM) und Detektion der Internen Positivkontrolle (Cy5).

2.9. Spezifikationen

ViroReal[®] Kit ASF Virus wurde am Applied Biosystems[®] 7500 (Fast) Instrument (Thermo Fischer Scientific) validiert. Für Validierungsdaten kontaktieren Sie bitte ingenetix.

2.9.1. Analytische Sensitivität

Ein positiver Nachweis kann bei einer Verdünnung bis zu einer Kopie/Reaktion erfolgen. Die Nachweisgrenze (LoD95 = Anzahl an Kopien, welche in 95% der Fälle positiv detektiert werden) beträgt 10 Kopien/Reaktion.

2.9.2. Analytische Spezifität

Die Spezifität wird aufgrund der Wahl hochspezifischer Primer und Sonde gewährleistet. Durch Sequenzvergleich wurden Primer und Sonde auf mögliche Homologien mit den derzeit publizierten Sequenzen überprüft. Dadurch wurde auch der Nachweis bis jetzt bekannter ASF Virus Stämme validiert.

ViroReal[®] Kit ASF Virus ist spezifisch für derzeit in Europa zirkulierende Viren. Es ist möglich, dass die Genotypen IX (Uganda), X (Tansania und Kenia) und XXIII (Ostafrika, Äthiopien, Demokratische Republik Kongo), sowie bislang unbekannte Genotypen, mit diesem Test nur schwach oder nicht nachgewiesen werden können.

3. Art der Aufbewahrung

Die Lagerung der Komponenten des ViroReal® Kit ASF Virus soll lichtgeschützt bei -20°C (± 5°C) erfolgen. Der DNA Reaktions Mix ist nach dem ersten Auftauen bei +2°C bis +8°C zu lagern.

4. Datum des Verfalls

Die Komponenten des ViroReal® Kit ASF Virus sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Ablaufdatum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden.

Anhang – Symbole



Hergestellt von



Bestell-Nummer



Ausreichend für "n" Ansätze



Verwendbar bis



Aufbewahrung bei

Erregerinformation

Das Virus der Afrikanischen Schweinepest (engl. African Swine Fever virus) ist das einzige Mitglied der Familie *Asfarviridae* und ein großes, doppelsträngiges DNA-Virus, das sich im Zytoplasma infizierter Zellen repliziert. Dieses Virus ist der Erreger der Afrikanischen Schweinepest, ein hämorrhagisches Fieber mit hoher Sterblichkeitsrate bei Hausschweinen, Europäischen Wildschweinen und Amerikanischen Wildschweinen. Seine natürlichen Wirte (Warzenschweine, Buschschweine) sind meist infiziert ohne klinische Symptome zu zeigen und fungieren als Wirte für das Virus der Afrikanischen Schweinepest in Afrika. Zecken (*Ornithodoros*) fungieren wahrscheinlich als Vektor. Das Virus der Afrikanischen Schweinepest tritt in Afrika südlich der Sahara endemisch auf. In den letzten Jahren gab es auch außerhalb Afrikas sporadische Ausbrüche.

References:

Oura CA, Edwards L, Batten CA. 2013. Virological diagnosis of African swine fever - comparative study of available tests. *Virus Res.* 173:150–8.