

Gebrauchsinformation

virellaASFV seqc

real time PCR Kit

In vitro Veterinärdiagnostikum zum Nachweis der DNA des Erregers der Afrikanischen Schweinepest (African Swine Fever Virus, ASFV) in Probenmaterialien von Schweinen und Wildschweinen (Blut, Gewebe, Tupferproben, Proben in konservierenden Transportmedien).

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 11 Absatz 2 TierGesG zugelassen.

Zul.-Nr.

FLI-C 080

REF

G01123-96

G01123-384



96

384



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
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 | 4 |
| 7 | Wichtige Hinweise | 5 |
| 8 | Allgemeine Hinweise..... | 5 |
| 9 | Art und Beschaffenheit des Probenmaterials | 5 |
| 10 | Probenvorbereitung..... | 5 |
| 11 | Kontrolle der Proben- und Extraktionsqualität | 6 |
| 11.1 | Kontroll-DNA als Extraktionskontrolle..... | 6 |
| 12 | Real time PCR..... | 7 |
| 12.1 | Wichtige Punkte bevor Sie starten:..... | 7 |
| 12.2 | Durchführung | 7 |
| 12.3 | Geräteeinstellungen | 8 |
| 13 | Interpretation der Ergebnisse | 10 |
| 14 | Validierung..... | 12 |
| 15 | Grenzen der Methode | 12 |
| 16 | Troubleshooting..... | 13 |
| 17 | Kit Performance | 15 |
| 17.1 | Analytische Sensitivität - ASFV | 15 |
| 17.2 | Analytische Sensitivität – Interne Systemkontrolle (ISC)..... | 16 |
| 17.3 | Linearität | 17 |
| 17.4 | Analytische Spezifität und Sensitivität - Zusammenfassung | 18 |
| 17.5 | Präzision | 18 |
| 18 | Abkürzungen und Symbole | 19 |

1 Anwendungszweck

In vitro Veterinärdiagnostikum zum Nachweis der DNA des Erregers der Afrikanischen Schweinepest (African Swine Fever Virus, ASFV) in Probenmaterialien von Schweinen und Wildschweinen (Blut, Gewebe, Tupferproben, Proben in konservierenden Transportmedien). Zur Erhöhung der Prozesssicherheit werden in jeder Nachweisreaktion eine Interne Prozesskontrolle (Extraktionskontrolle, IPC) und eine Interne Systemkontrolle (β -Actin, ISC) koamplifiziert.

Das Zusammenführen (Poolen) von Proben ist nach Maßgabe der Amtlichen Methodensammlung möglich. Bitte informieren Sie sich über den jeweils aktuellen Stand auf www.fli.de/de/publikationen/amtliche-methodensammlung.

2 Anwendungsbereich

Die Afrikanische Schweinepest ist eine anzeigepflichtige Tierseuche, von der Haus- und Wildschweine betroffen sind. In den afrikanischen Ursprungsländern übertragen Lederzecken das ASFV. Diese spielen in Mitteleuropa für die Übertragung keine Rolle. Hier erfolgt eine Übertragung durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren (Sekrete, Blut, Sperma), die Aufnahme von Speiseabfällen oder Schweinefleischerzeugnissen bzw. -zubereitungen sowie andere indirekte Übertragungswege (Fahrzeuge, kontaminierte Ausrüstungsgegenstände einschl. Jagdausrüstung, landwirtschaftlich genutzte Geräte und Maschinen sowie Kleidung). Der Kontakt mit Blut ist der effizienteste Übertragungsweg. Nach einer Infektion entwickeln die Tiere sehr schwere, aber unspezifische Allgemeinsymptome. Die Afrikanische Schweinepest ist keine Zoonose, also zwischen Tier und Mensch übertragbare Infektionskrankheit, und daher für den Menschen ungefährlich.

3 Testprinzip

Der *virellaASFV seqc* real time PCR Kit enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden und zusätzliches Material zum simultanen Nachweis der DNA des Erregers der Afrikanischen Schweinepest (African Swine Fever Virus, ASFV), der Internen Prozesskontrolle (IPC) und der Internen Systemkontrolle (ISC) mittels real time PCR in offenen real time PCR Systemen (z. B. Stratagene Mx3000/3005, Agilent Aria Mx, Roche LightCycler 480I/480II, LifeTechnologies ABI 7500, ThermoFisher Scientific QuantStudio 5, Qiagen Q-Cycler, BioRad CFX96, BMS mic qPCR Cycler).

Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der ASFV-spezifischen Cy5-markierten Fluoreszenz-Sonden. Der *virellaASFV seqc* real time PCR Kit verfügt über eine Kontroll-DNA (IPC), die während der Extraktion zugefügt und in einem heterologen Amplifikationssystem nachgewiesen wird. Die Detektion der Amplifikation der Kontroll-DNA (IPC) erfolgt im HEX-Kanal.

Darüber hinaus wird in einem weiteren heterologen Amplifikationssystem ein zellulärer Genbereich (Succinat-Dehydrogenase, Interne Systemkontrolle, ISC) amplifiziert. Die Detektion der Amplifikation der ISC erfolgt im ROX-Kanal. Die Kontrolle der Proben- und Extraktionsqualität (seqc – sample and extraction quality control) mit Hilfe der ISC und IPC ermöglicht das Aufdecken von Fehlern bei der Extraktion, mögliche inhibitorische Effekte in der PCR und gibt Aufschlüsse über die Qualität des extrahierten zellhaltigen Probenmaterials.

4 Komponenten

Die Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 bzw. 384 Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Komponenten des virellaASFV seqc real time PCR Kit.

| Bezeichnung | Deckelfarbe | Inhalt G01123-96 | Inhalt G01123-384 |
|------------------|-------------|---------------------|----------------------|
| Reaktionsmix | gelb | 1 x 1344 µl | 4 x 1344 µl |
| Positivkontrolle | rot | 1 x 150 µl | 1 x 150 µl |
| Negativkontrolle | grün | 1 x 150 µl | 1 x 150 µl |
| Kontroll-DNA | farblos | 1 x 480 µl | 2 x 960 µl |

5 Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Extraktionskit (z. B. NukEx Mag RNA/DNA, gerbion Art. Nr. G05012)
- sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortexer
- real time PCR Gerät
- Color Compensation Kit Multiplex 1 für Roche LightCycler 480II (gerbion Art. Nr. G070MP1-CC)
- optische PCR Gefäße mit Verschluss
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

6 Transport, Lagerung und Haltbarkeit

Der Transport des virellaASFV seqc real time PCR Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis oder auf Kühllakkus. Alle Komponenten des virellaASFV seqc real time 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 können diese bei +2 °C bis +8 °C für maximal 6 Monate gelagert werden. Falls die Reagenzien bei -18 °C oder niedrigeren Temperaturen gelagert werden, sind bis zu 20 Auftau- und Einfrierzyklen möglich. Kitkomponenten während der gesamten Verwendung vor direktem Sonnenlicht schützen.

7 Wichtige Hinweise

- Die virellaASFV seqc real time 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 potenziell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potenziell kontaminiert erachtet werden.

8 Allgemeine Hinweise

- Die Anweisungen der Gebrauchsinformation sind einzuhalten.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Mastermix sollten strikt getrennt sein.
- Immer Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Komponenten verschiedener Chargen des virellaASFV seqc real time PCR Kit dürfen nicht zusammen verwendet werden.

9 Art und Beschaffenheit des Probenmaterials

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist DNA, die aus Einzelproben oder Poolproben von Schweinen und Wildschweinen aus Blut, Gewebe, Tupferproben und Proben in konservierenden Transportmedien mittels geeigneter Verfahren extrahiert wurde.

10 Probenvorbereitung

Es wird empfohlen, kommerziell erhältliche Extraktionskits zu verwenden, wie z. B.:

- NukEx Mag RNA/DNA, gerbion Art. Nr. G05012
- NukEx Pure RNA/DNA, gerbion Art. Nr. G05004
- QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit, Qiagen Art. Nr. 54104/54106
- MagMax Core Nucleic Acid Purification Kit, ThermoFisher, Art. Nr. A32700/A32702

Wichtig: Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen beurteilen lassen. Diese

Wasserkontrolle muss analog einer zu untersuchenden Probe behandelt werden. Ein verspätetes Erreichen des C_T -Wertes der IPC (HEX-Kanal) im Eluat einer Probe von >4 C_T im Vergleich zum C_T -Wert der IPC im Eluat des extrahierten Wassers deutet auf die Anwesenheit von Inhibitoren in der Nachweisreaktion hin.

Beachten Sie bitte auch den Abschnitt „Kontrolle der Proben- und Extraktionsqualität“.

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

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

Poolen von Proben

Bitte informieren Sie sich über den jeweils aktuellen Stand auf www.fli.de/de/publikationen/amtliche-methodensammlung.

Blutproben und Proben in konservierenden Transportmedien

Gleich große Aliquots (z. B. je 100 μ l) von Einzelproben poolen und gut mischen (vortexen), anschließend nach Herstellervorschrift extrahieren.

Gewebeproben und Tupferproben

Gleich große Aliquots (z. B. je 10 μ l) der Aufschlussüberstände von Einzelproben poolen und danach gut mischen (vortexen). Pool nach Herstellervorschrift extrahieren.

11 Kontrolle der Proben- und Extraktionsqualität

Der virellaASFV seqc real time PCR Kit enthält eine Kontroll-DNA (IPC), die während der Extraktion zugefügt und im HEX-Kanal detektiert wird. Im ROX-Kanal wird die Amplifikation eines zellulären Genbereiches (Succinat-Dehydrogenase, Interne Systemkontrolle, ISC) detektiert. Die Detektion der beiden Kontrollen ermöglicht das Aufdecken von Fehlern bei der Extraktion sowie möglicher Inhibitionen der PCR und gibt Aufschlüsse über die Qualität des extrahierten Probenmaterials. Dadurch wird das Risiko von falsch-negativen Ergebnissen reduziert.

11.1 Kontroll-DNA als Extraktionskontrolle

5 μ l Kontroll-DNA zu jeder Extraktion zugeben (5 μ l x (N+1)), gut mischen.

Führen Sie die Extraktion gemäß der Anleitung des Herstellers durch.

Die Kontroll-DNA darf nicht dem Probenmaterial zugegeben werden.

12 Real time PCR

12.1 Wichtige Punkte bevor Sie starten:

- Bitte beachten sie die ‚Wichtigen Hinweise‘ auf Seite 5.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR Lauf mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Bevor Sie die real time PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem real time PCR Gerät vertraut. Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die real time PCR angesetzt wird.
- Alle Reagenzien müssen komplett aufgetaut, gemischt und kurz anzentrifugiert werden.

12.2 Durchführung

Tabelle 2: Herstellung des Mastermix

| Reaktionsvolumen | Mastermix Volumen |
|----------------------|-------------------|
| 14,0 µl Reaktionsmix | 14,0 µl x (N+1) |

Ansetzen der real time PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in die dafür vorgesehene Aufnahmevorrichtung des verwendeten real time PCR Geräts stellen bzw. eine optische Mikrotiterplatte verwenden.
- **14 µl** des Mastermixes in jedes Gefäß bzw. in die entsprechende Kavität der optischen Mikrotiterplatte pipettieren.
- **6 µl** der Nukleinsäureeluate (inklusive Eluate der Wasserkontrollen), der Positivkontrolle und der Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße bzw. in die entsprechende Kavität der optischen Mikrotiterplatte pipettieren.
- Die Reaktionsgefäße bzw. die optische Mikrotiterplatte sofort nach Zugabe der Eluate verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.
- Bei Verwendung eines Roche 480II real time PCR Gerätes müssen die verschlossenen Gefäße bzw. die verschlossene optische Mikrotiterplatte kurz zentrifugiert werden.

Tabelle 3: Ansetzen der real time PCR.

| Komponente | Volumen |
|---------------|---------|
| Mastermix | 14,0 µl |
| Probe | 6,0 µl |
| Gesamtvolumen | 20,0 µl |

12.3 Geräteeinstellungen

Für die real time PCR muss das in Tabelle 4 beschriebene Temperaturprofil benutzt werden.

Tabelle 4: real time PCR Temperaturprofil

| Bezeichnung | Zeit | Temperatur | Anzahl der Zyklen |
|-------------------------------|----------------------------------|------------|-------------------|
| Reverse Transkription* | 20 min | 50°C | 1 |
| Initiale Denaturierung | 15 min | 95°C | 1 |
| Amplifikation der DNA | | | |
| Denaturierung | 15 sec | 95°C | 45 |
| Annealing | 30 sec | 57°C | |
| | Messung am Ende dieses Schrittes | | |
| Elongation | 30 sec | 72°C | |

*Das Temperaturprofil entspricht dem Profil für alle Nachweisverfahren von gerbion zur Detektion der Erreger der Klassischen Schweinepest (CSFV) und der Afrikanischen Schweinepest (ASFV).

Je nach real time PCR Gerät sind weitere Geräteeinstellungen vorzunehmen.

Tabelle 5 gibt beispielhaft eine Übersicht über die notwendigen Einstellungen bei gängigen real time PCR Geräten. Für Angaben zu Einstellungen an weiteren real time PCR Geräten kontaktieren Sie bitte unseren Service unter info@gerbion.com.

Tabelle 5: Übersicht über die notwendigen Geräteeinstellungen.

| Real time PCR Gerät | Parameter | Detektions-Kanal | Bemerkungen | | |
|---|-----------|------------------|---|---------------------|----------------------------|
| LightCycler 480II | | | Color Compensation Kit Multiplex 1 (G070MP1-CC) wird benötigt | | |
| | | | Melt Factor | Quant Factor | Max Integration Time (sec) |
| | ASFV | CY5 (618-660) | 1 | 10 | 3 |
| | IPC | HEX (533-580) | 1 | 10 | 2 |
| | ISC | ROX (533-610) | 1 | 10 | 2 |
| Stratagene Mx3000 / Mx3005 | ASFV | CY5 | Gain 4 | | |
| | IPC | HEX | Gain 1 | Reference Dye: None | |
| | ISC | ROX | Gain 1 | | |
| AriaMx CFX96 | ASFV | CY5 | Reference Dye: None | | |
| | IPC | HEX | | | |
| | ISC | ROX | | | |
| ABI 7500 QuantStudio 5 | ASFV | CY5 | Option Reference Dye ROX: NO | | |
| | IPC | HEX | | | |
| | ISC | ROX | | | |
| Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000 | ASFV | Red | Gain 5 | | |
| | IPC | Yellow | Gain 5 | | |
| | ISC | Orange | Gain 5 | | |
| mic qPCR Cycler | ASFV | Red | Gain 10 | | |
| | IPC | Yellow | Gain 10 | | |
| | ISC | Orange | Gain 10 | | |

13 Interpretation der Ergebnisse

Die Amplifikation der DNA des Erregers der Afrikanischen Schweinepest wird im Cy5-Kanal (rot) gezeigt. Die Amplifikation der Kontroll-DNA (IPC) wird im HEX-Kanal (gelb) gemessen. Die Detektion der Amplifikation der Internen Systemkontrolle (ISC) erfolgt im ROX-Kanal (orange).

Folgende Ergebnisse können auftreten:

| Cy5 (rot) ASFV | Ct-Werte | | Interpretation |
|----------------------|----------------------|------------------------|---|
| | HEX (gelb) IPC | ROX (orange) ISC | |
| positiv | positiv oder negativ | positiv oder negativ | Positives Ergebnis, die Probe enthält DNA von ASFV. Valides Resultat. Die Ergebnisse der IPC und ISC sind irrelevant. |
| negativ | positiv | positiv | Negatives Ergebnis, die Probe enthält keine DNA von ASFV. Valides Resultat. |
| negativ | negativ | positiv | Extraktionsprobleme oder PCR-Inhibition. Invalides Resultat. Probe verdünnen oder nochmals extrahieren und PCR wiederholen. |
| negativ | positiv | negativ | Nicht genügend oder schlechtes Probenmaterial. Invalides Resultat. Frisches Probenmaterial extrahieren und PCR wiederholen. |
| negativ | negativ | negativ | Invalides Resultat. Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden. Die real time PCR ist entweder inhibiert oder es traten Fehler während der Extraktion auf. |

*Je nach Gerät und verwendeter Extraktionsmethode können sich die C_T -Bereiche der Kontroll-DNA etwas verschieben. Als Referenz dient der C_T -Wert der ebenfalls extrahierten Wasserkontrolle. Mit den in **Kapitel 10 Probenvorbereitung** genannten Extraktionsverfahren liegt der C_T -Wert der extrahierten Wasserkontrolle bei 28 – 32. Unterscheidet sich der C_T -Wert für die Wasserkontrolle im HEX-Kanal stark von dem C_T -Wert der Probe ($>4 C_T$ verspätet auftretendes Signal im Vergleich zur Wasserkontrolle), so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht detektiert werden (siehe „Troubleshooting“, Seite 13).

Abbildung 1, Abbildung 2 und Abbildung 3 zeigen Beispiele für positive und negative real time PCR Ergebnisse.

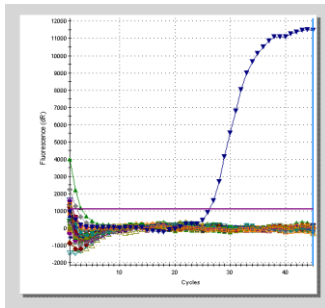


Abbildung 1: Detektion amplifizierter ASFV-DNA im Cy5-Kanal. Bei negativen Proben wird kein Fluoreszenzsignal detektiert.

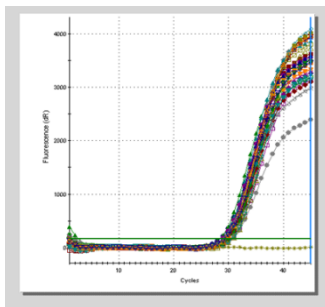


Abbildung 2: Detektion der IPC-Amplifikation im HEX-Kanal.

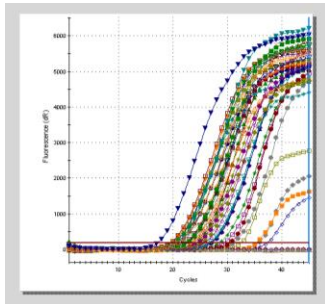


Abbildung 3: Detektion der ISC-Amplifikation im ROX-Kanal. Unterschiedliche C_T -Werte ergeben sich aus der jeweiligen Qualität und Quantität der DNA im Probenmaterial/Eluat.

14 Validierung

Negativkontrolle

Die Negativkontrolle muss im Cy5-Kanal (rot) unterhalb des Thresholds liegen. Bei einer potenziellen Kontamination dieser Kontrolle (Auftreten einer Kurve) sind die Ergebnisse des Testes nicht auswertbar. Der Test muss wiederholt werden.

Positivkontrolle

Die Positivkontrolle muss im Cy5-Kanal (rot) einen sigmoiden Kurvenverlauf zeigen. Der C_T -Wert der Positivkontrolle muss <30 betragen. Eine Positivkontrolle außerhalb dieses Bereichs gibt einen Hinweis auf ein Problem bei der Amplifikation. In diesem Fall muss der Test wiederholt werden.

Interne Systemkontrolle, ISC

Die ISC muss im ROX-Kanal (orange) einen sigmoiden Kurvenverlauf zeigen. Die C_T -Werte sollten hierbei unter 35 liegen. Höhere C_T -Werte deuten auf zu wenig oder zu stark zersetztes Probenmaterial hin.

Stark positive ASFV Proben können zu einem Ausfall der Amplifikation der ISC führen. Umgekehrt wurde ein kompetitiver Effekt auf schwach positive ASFV Proben, ausgelöst durch eine starke Beladung eines Eluates mit zellulärer DNA, experimentell ausgeschlossen.

Interne Prozesskontrolle, IPC

Die IPC muss im HEX-Kanal (gelb) einen sigmoiden Kurvenverlauf zeigen. Die C_T -Werte der IPC in Reaktionsansätzen mit Eluaten aus Probenmaterial sollten maximal 4 C_T -Werte später als die C_T -Werte in Reaktionsansätzen mit eluierter Wasserkontrolle auftreten. Stark positive Proben im Cy5-Kanal können zu einem Ausfall der IPC im HEX-Kanal führen. In diesem Fall ist das Ergebnis der Probe valide.

15 Grenzen der Methode

Die virellaASFV seqc real time PCR kann nicht direkt mit biologischen Materialien durchgeführt werden. Vor der Anwendung des Tests müssen geeignete Nukleinsäure-Extraktionsverfahren durchgeführt werden.

Wie bei jedem in vitro diagnostischen Test müssen die Ergebnisse, die mit dem virellaASFV seqc real time PCR Kit erzielt wurden, immer in Verbindung mit dem klinischen Bild betrachtet werden. Ein negatives Testresultat kann eine Infektion mit dem Erreger der Afrikanischen Schweinepest nicht ausschließen.

16 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.

Kein Fluoreszenzsignal im Cy5-Kanal der Positivkontrolle.

| | |
|---|--|
| Der gewählte Kanal entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen Kanal. | Wählen Sie den Cy5-Kanal (rot) für die Analyse der ASFV-spezifischen Amplifikation, den ROX-Kanal (orange) für die Amplifikation der ISC und den HEX-Kanal (gelb) für die Amplifikation der IPC. |
| Fehlerhaftes Ansetzen der real time PCR. | Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den in „Durchführung“ auf den Seiten 7 ff. beschriebenen Arbeitsschritten. |
| Fehlerhaftes real time PCR Temperaturprofil. | Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll Tabelle 4 auf Seite 8. |
| 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 4 unter „Transport, Lagerung und Haltbarkeit“ beschrieben. |

Schwaches oder kein Signal der Kontroll-DNA (IPC) und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im Cy5-Kanal.

| | |
|---|---|
| Die real time PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein. | Überprüfen Sie die real time PCR-Bedingungen (Seite 7). |
| Real time PCR Inhibition. | Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe „Probenvorbereitung“, Seite 5) und beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden. Bei Verwendung einer Magnetpartikelextraktion sollte das Abdampfen von Ethanolresten gewährleistet sein, bevor das Eluat in die real time PCR eingesetzt wird. |
| Real time PCR Inhibition | Als Alternative zu einer erneuten Extraktion inhibierter Proben empfehlen wir die Verdünnung der entsprechenden Eluate 1:3 in Wasser (PCR-grade, nukleasefrei) und die anschließende Wiederholung der real time PCR. |

| | |
|--|---|
| Verlust der DNA während des Aufarbeitungsprozesses. | Das Ausbleiben eines Signals für die IPC deutet auf eine fehlerhafte Extraktion hin. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden. 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 4 unter „Transport, Lagerung und Haltbarkeit“ beschrieben. |
| Schwaches oder kein Signal im ROX-Kanal und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im Cy5-Kanal. | |
| Ungenügende Probenmenge. | Wiederholen Sie die Extraktion mit einer größeren Menge an Probenmaterial. |
| Unzureichende Probenqualität bzw. unzureichender Probenaufschluss. | Überprüfen Sie die Haltbarkeit des genutzten Extraktionskits. Falls Sie eine Gewebeprobe extrahieren, stellen Sie sicher, dass das Gewebe mechanisch und/oder enzymatisch aufgeschlossen wird. Je nach Extraktionskit-Hersteller sind hierfür zusätzliche Reagenzien und Verbrauchsmaterialien erforderlich. |
| Detektion eines Signals im Cy5-Kanal der Negativkontrolle. | |
| Kontamination des real time PCR Ansatzes. | Wiederholen Sie die real time PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal im Cy5-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 PCR mit einem neuen Kit. |

17 Kit Performance

17.1 Analytische Sensitivität - ASFV

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection (LoD)) der virellaASFV seqc real time PCR wurde anhand der Amplifikation serieller Verdünnungen von ASFV-DNA mit bekannter Konzentration mittels eines Stratagene Mx3005 real time PCR Instrumentes ermittelt. Die LoD der virellaASFV seqc real time PCR liegt bei mindestens 10 Kopien pro Reaktionsansatz.

Tabelle 6: Werte der Prüfung der Nachweisgrenze der virellaASFV seqc real time PCR anhand einer Verdünnungsreihe – Cy5-Kanal (ASFV).

| Probenbezeichnung | Kopien pro Reaktion | C _T -Wert | C _T Mittelwert |
|-------------------|---------------------|----------------------|---------------------------|
| | | Cy5-Kanal | |
| ASFV | 10000000 | 13,67 | 13,69 |
| | | 13,91 | |
| | | 13,48 | |
| ASFV | 1000000 | 16,72 | 16,85 |
| | | 17,10 | |
| | | 16,72 | |
| ASFV | 100000 | 19,81 | 20,22 |
| | | 20,64 | |
| | | 20,21 | |
| ASFV | 10000 | 23,60 | 23,42 |
| | | 23,35 | |
| | | 23,30 | |
| ASFV | 1000 | 26,82 | 27,06 |
| | | 27,23 | |
| | | 27,13 | |
| ASFV | 100 | 29,96 | 29,60 |
| | | 29,13 | |
| | | 29,72 | |
| ASFV | 10 | 31,83 | 32,44 |
| | | 32,75 | |
| | | 32,74 | |
| ASFV | 1,0 | 45,00 | 39,95 |
| | | 36,78 | |
| | | 38,06 | |

Zur Berechnung des Mittelwerts wurde für negative Werte ein C_T-Wert von 45 eingesetzt.

17.2 Analytische Sensitivität – Interne Systemkontrolle (ISC)

Die Sensitivität der virellaASFV seqc real time PCR für die interne Systemkontrolle wurde anhand einer Verdünnungsreihe der ISC-Zielsequenz mit bekannter Konzentration hergestellt und im 3-fach Ansatz getestet.

Die Nachweisgrenze der virellaASFV seqc real time PCR für die interne Systemkontrolle liegt bei 0,1 Kopien pro PCR-Ansatz.

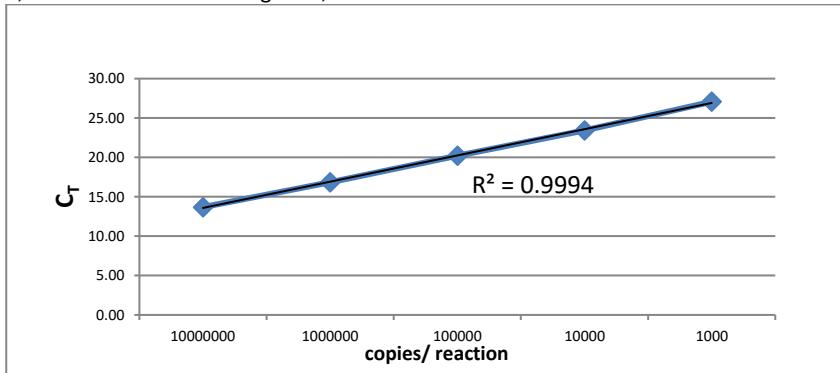
Tabelle 7: Werte der Prüfung der Nachweisgrenze der virellaASFV seqc real time PCR anhand einer Verdünnungsreihe – ROX-Kanal (ISC).

| Probenbezeichnung | Kopien pro Reaktion | CT-Wert | Cr Mittelwert |
|-------------------|---------------------|-----------|---------------|
| | | ROX-Kanal | |
| ISC | 10000000 | 14,36 | 14,31 |
| | | 14,58 | |
| | | 13,99 | |
| ISC | 1000000 | 17,53 | 17,61 |
| | | 17,75 | |
| | | 17,56 | |
| ISC | 100000 | 20,32 | 20,27 |
| | | 20,08 | |
| | | 20,41 | |
| ISC | 10000 | 22,16 | 22,33 |
| | | 22,65 | |
| | | 22,17 | |
| ISC | 1000 | 25,31 | 25,28 |
| | | 25,43 | |
| | | 25,12 | |
| ISC | 100 | 28,01 | 28,15 |
| | | 28,53 | |
| | | 27,90 | |
| ISC | 10 | 31,48 | 31,35 |
| | | 31,34 | |
| | | 31,23 | |
| ISC | 1 | 34,51 | 34,97 |
| | | 35,68 | |
| | | 34,73 | |
| ISC | 0,1 | 37,89 | 37,60 |
| | | 36,87 | |
| | | 38,04 | |

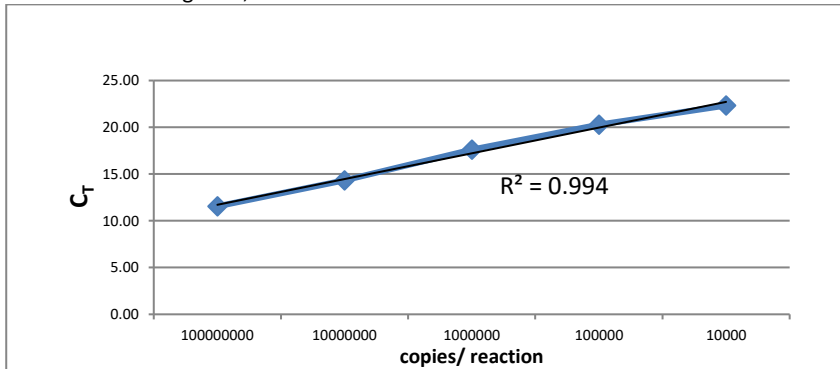
17.3 Linearität

Die Linearität wurde mittels Verdünnungsreihen ermittelt.

Der R^2 -Wert der virellaASFV seqc real time PCR für den Cy5-Kanal (ASFV) liegt bei 0,9994. Die Effizienz beträgt 106,504 %.



Der R^2 -Wert der virellaASFV seqc real time PCR für den ROX-Kanal (ISC) liegt bei 0,994. Die Effizienz beträgt 118,477 %.



17.4 Analytische Spezifität und Sensitivität - Zusammenfassung

Die analytische Spezifität und Sensitivität wurden mit definierten Referenz- und Feldproben, die sowohl positiv als auch negativ für ASFV waren, sowie definierten Ringversuchs- und Feldproben, die positiv für andere Krankheitserreger waren, ermittelt. Die analytische Spezifität und Sensitivität der virellaASFV seqc real time PCR liegen bei jeweils 100 %.

Tabelle 8: Sensitivität und Spezifität der virellaASFV seqc real time PCR.

| | positive Proben | negative Proben |
|---------------------------------|------------------|-----------------|
| virellaASFV seqc positiv | 23 | 0 |
| virellaASFV seqc negativ | 0 | 150 |
| | Sensitivität (%) | Spezifität (%) |
| | 100 | 100 |

17.5 Präzision

Die Präzision der virellaASFV seqc real time PCR wurde anhand der Intra-Assay Variabilität und der Inter-Chargen Variabilität ermittelt. Daten zur Variabilität werden anhand der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten dargestellt.






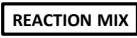





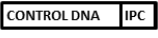
Tabelle 1: Präzision der virellaASFV seqc real time PCR.

| ASFV (Cy5) | Kopien/Reaktion | Standardabweichung | Variationskoeffizient [%] |
|----------------------------|-----------------|--------------------|----------------------------|
| Intra-Assay Variabilität | 10 | 0,57 | 1,74 |
| Inter-Chargen Variabilität | 10 | 0,01 | 0,02 |

| IPC (HEX) | Kopien/Reaktion | Standardabweichung | Variationskoeffizient [%] |
|----------------------------|-----------------|--------------------|----------------------------|
| Intra-Assay Variabilität | 10.000 | 0,26 | 0,94 |
| Inter-Chargen Variabilität | 10.000 | 0,18 | 0,65 |

| ISC (ROX) | Kopien/Reaktion | Standardabweichung | Variationskoeffizient [%] |
|----------------------------|-----------------|--------------------|----------------------------|
| Intra-Assay Variabilität | 10 | 0,26 | 0,81 |
| Inter-Chargen Variabilität | 10 | 0,19 | 0,60 |

18 Abkürzungen und Symbole

| | | | |
|---|--|---|---------------------------------------|
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |  | Artikelnummer |
| PCR | Polymerase Ketten Reaktion |  | Inhalt ausreichend für x Prüfungen |
| ASFV | African Swine Fever Virus |  | Gebrauchsinformation beachten |
| seqc | sample and extraction quality control |  | Obere Temperaturbegrenzung |
| ISC | Interne Systemkontrolle |  | Hersteller |
|  | Reaktionsmix |  | Verwendbar bis JJJ-MM-TT |
|  | Positivkontrolle |  | Chargenbezeichnung |
|  | Negativkontrolle |  | Inhalt |
|  | Kontroll-DNA (IPC) | | |