

virotype[®] ASFV PCR Kit

Gebrauchsinformation

Zum Nachweis von DNA des Virus der
Afrikanischen Schweinepest (ASFV)

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 11 Absatz 2 TierGesG
zugelassen. Zulassungs-Nr.: FLI-B 670



96 Reaktionen (Katalog-Nr. VT281905)



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Leipzig, Deutschland

Inhalt

Kit-Inhalt	3
Verwendungszweck.....	3
Symbole	4
Qualitätskontrolle.....	4
Lagerung.....	5
Sicherheitshinweise.....	5
Einleitung	6
Testprinzip	7
DNA-Extraktion	8
Zusätzlich benötigte Materialien.....	10
Wichtige Hinweise.....	11
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	11
Protokoll: Real-time PCR zum Nachweis von DNA des Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASFV).....	13
Wichtige Hinweise vor Beginn.....	13
Vorbereitungen	13
Durchführung	14
Auswertung	16
Interpretation der Ergebnisse.....	16
Änderungsindex.....	20

Kit-Inhalt

virotype ASFV PCR Kit	(96)
Katalog-Nr.	VT281905
Anzahl der Reaktionen	96
Master Mix (Master-Mix, orangefarbener Deckel), enthält Enzyme, Primer und Sonden	2 x 980 µl
Positive Control (Positivkontrolle, roter Deckel)	1 x 150 µl
Negative Control (Negativkontrolle, blauer Deckel)	1 x 150 µl
Gebrauchsinformation	1

Verwendungszweck

virotype ASFV PCR Kit ist ein real-time PCR Testkit für den sicheren Nachweis der DNA des Virus der Afrikanischen Schweinepest (*African Swine Fever Virus*, ASFV). Es können Blut, Gewebe, Tupfer, konservierende Transportmedien und Umweltproben von Haus- und Wildschweinen verwendet werden. Ein Zusammenführen (Poolen) von Proben ist nach Maßgabe der Amtlichen Methodensammlung möglich.

Der Kit besitzt die Zulassung des Friedrich-Loeffler-Instituts nach § 11 Absatz 2 TierGesG mit der Zulassungsnummer FLI-B 670.

Nur für den tierärztlichen Gebrauch.

Symbole



Legaler Hersteller



Chargenbezeichnung



Zur Verwendung bis



Zulässiger Temperaturbereich für die Lagerung



Gebrauchsinformation



Katalognummer



Materialnummer



Vor Licht schützen



Für Proben von Haus- und Wildschwein

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von INDICAL wird jede Charge des virotype ASFV PCR Kits nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Lagerung

Die Komponenten des virotype ASFV PCR Kits sind bei -30°C bis -15°C zu lagern – unter diesen Lagerbedingungen sind sie mindestens bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 2x), da dadurch die Sensitivität des Assays verringert werden kann. Falls die Komponenten nur gelegentlich verwendet werden, frieren Sie sie aufgeteilt in Aliquots ein.

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen (safety data sheets, SDS). Diese erhalten sie von Ihrem lokalen Vertriebsmanager oder per Email von compliance@indical.com.

Alle Reste von Proben und mit Proben in Berührung gekommene Gegenstände sind als potenziell infektiöse Materialien zu entsorgen bzw. zu dekontaminieren.

Einleitung

virotype ASFV PCR Kit ist ein hochempfindliches und spezifisches Produkt zum Nachweis der DNA des Virus der Afrikanischen Schweinepest (*African Swine Fever Virus*, ASFV) in Proben von Haus- und Wildschweinen.

Die Afrikanische Schweinepest ist eine der wichtigsten viralen Infektionskrankheiten bei Haus- und Wildschweinen aller Altersklassen und verursacht eine große Bandbreite klinischer Symptome, die von hoher Erkrankungs- und Sterblichkeitsrate geprägt ist. Es handelt sich um eine anzeigepflichtige Tierseuche der WOAH (World Organization for Animal Health).

Der Erreger der Afrikanischen Schweinepest ist ein doppelsträngiges DNA-Virus, das zum Genus *Asfivirus* innerhalb der Familie *Asfarviridae* gehört. Das ASF-Virus kann durch Vektoren (Zecken des Genus *Ornithodoros*) übertragen werden und ist daher als *Arbovirus* (*arthropod-borne virus*) klassifiziert.

Durch seine hohe Sensitivität ermöglicht der virotype ASFV PCR Kit den sicheren und frühzeitigen Nachweis der DNA des Erregers sowohl aus Blut, Gewebe, Tupfern, konservierenden Transportmedien und Umweltproben (in Einzel- als auch in Poolproben).

Testprinzip

Beim Nachweis von Pathogenen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Bereiche aus dem Genom des Pathogens amplifiziert. Bei der real-time PCR wird das entstandene Amplifikat mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen detektiert. Diese sind in der Regel an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt, die spezifisch an das Amplifikat binden. Die Beobachtung des Verlaufs der Fluoreszenzintensität während der PCR in Echtzeit („real-time PCR“) ermöglicht den Nachweis des sich anreichernden Produkts, ohne die Reaktionsgefäße danach wieder öffnen zu müssen.

Der virotype ASFV PCR Kit enthält alle Reagenzien, die für den Nachweis der ASFV-DNA notwendig sind, einschließlich Positiv- und Negativkontrolle. Durch eine interne Kontrolle werden falsch-negative Ergebnisse ausgeschlossen.

Im Kit werden zwei spezifische Primer-Sonden-Kombinationen verwendet:

- FAM™-Fluoreszenz für DNA von ASFV
- HEX™-Fluoreszenz für die endogene interne Kontrolle (EC, Beta-Actin aus der Probe)

Mit der Positivkontrolle, die ASFV-DNA enthält, wird die Funktionalität des Pathogentests nachgewiesen, also zum Beispiel das korrekte Ansetzen des Reaktionsgemisches.

DNA-Extraktion

Der virotype ASFV PCR Kit ist geeignet zum Nachweis von ASFV-DNA aus Blut, Gewebe, Tupfern, konservierenden Transportmedien und Umweltproben von Haus- und Wildschweinen.

Aufgrund der hohen Sensitivität des Testkits können sowohl Einzel- als auch Poolproben untersucht werden. Ein Zusammenführen (Poolen) von Proben ist nach Maßgabe der Amtlichen Methodensammlung möglich. Bei Proben von Fallwild wird zur Testung von Einzelproben geraten.

Vor der real-time PCR muss die virale DNA aus dem Ausgangsmaterial extrahiert werden. INDICAL bietet für die DNA-Extraktion aus Tierproben validierte Produkte an.

Extraktionskit mittels „magnetic bead“-Verfahren:

- **IndiMag® Pathogen Kit*** (SP947457)
- **IndiMag Pathogen Kit w/o plastics*** (SP947257)
- **IndiMag Pathogen IM48 Cartridge** (SP947654P608, SP947654P224)
- **IndiMag Pathogen IM2 Cartridge** (SP957654C608)
- **IndiMag Pathogen KF96 Cartridge** (SP947855P196, SP947855P496)

Extraktionskits mit Verwendung von Spin Columns:

- **IndiSpin® Pathogen Kit*** (SP54104, SP54106)
- **IndiSpin QIAcube® HT Pathogen Kit*** (SP54161; nicht für die Extraktion aus Blutproben geeignet)

* für die simultane Extraktion von ASFV-DNA und CSFV-RNA geeignet

Hinweis: Bei Verwendung schwieriger Probenmatrices wird empfohlen, die Extraktion unter Verwendung des Pretreatment T4 (Phenolextraktion) durchzuführen bzw. zu wiederholen.

Falls die real-time PCR nicht unmittelbar nach der Extraktion durchgeführt wird, lagern Sie die DNA bei -20°C, bzw. bei -80°C für längere Zeit.

Für weitere Informationen zur automatisierten oder manuellen Extraktion von ASFV-DNA aus verschiedenen Probenmatrices, lesen Sie entweder das entsprechende Handbuch oder kontaktieren sie den INDICAL Support unter support@indical.com.

Zusätzlich benötigte Materialien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (safety data sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

- Pipetten
- Nuklease-freie aerosolgeschützte Pipettenspitzen mit Filter
- Sterile 1,5 ml Eppendorf®-Reaktionsgefäße
- Nuklease-freie (RNase/DNase-frei) Verbrauchsmaterialien
- Kühlvorrichtung oder Eis
- Tischzentrifuge mit Rotor für 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Real-time Thermocycler mit geeigneten Fluoreszenzkanälen
- Geeignete Software für den gewählten Thermocycler
- Geeignete PCR-Streifen und Deckel oder optische 96-well Mikrotiterplatte mit optischer Verschlussfolie oder optischem Deckel für den gewählten Thermocycler

Wichtige Hinweise

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Nuklease-freie Pipettenspitzen mit Filter verwenden
- Positivmaterial (Proben, Positivkontrollen, sowie Amplifikate) separat von allen anderen Reagenzien lagern und verarbeiten und in einem räumlich getrennten Bereich zum Reaktionsgemisch hinzufügen.
- Alle Komponenten vor Testbeginn auf Eis auftauen lassen.
- Nach dem Auftauen die Komponenten durch Umdrehen mischen und anschließend kurz anzentrifugieren.
- Die Komponenten des Testkits nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Proben und Kontrollen während des Ansetzens auf Eis oder in einem Kühlblock halten.

Negativkontrolle

Bei jedem PCR-Lauf sollte mindestens eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Hierdurch können etwaige Kontaminationen im Reaktionsansatz entdeckt werden.

Positivkontrolle

Bei PCR-Ansätzen mit unbekanntem Proben wird empfohlen, eine Positivkontrolle im PCR-Lauf mitzuführen, das heißt eine Probe, von der bekannt ist, dass sie die interessierende virale DNA enthält. Mit einer Positivkontrolle wird die Funktionalität des Pathogentests nachgewiesen, also zum Beispiel das korrekte Ansetzen des Reaktionsgemisches. Setzen Sie 5 µl der im virotype ASFV PCR Kit mitgelieferten Positivkontrolle ein, um die erfolgreiche Amplifikation der Zielsequenz zu überprüfen.

Extraktions- und Amplifikationskontrolle

Zusätzliche Prozesssicherheit und Benutzerfreundlichkeit wird durch den in Form eines zweiten Primer-Sonden-Satzes enthaltenen Internen Kontrollansatzes (IC) gewährleistet, mit dem ein in der Probe vorhandenes Housekeeping-Gen nachgewiesen wird. Damit ist eine Kontrolle sowohl der Extraktion als auch der Amplifikation möglich.

Protokoll: Real-time PCR zum Nachweis von DNA des Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASFV)

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie bitte den Abschnitt "Wichtige Hinweise" auf Seite 11, bevor Sie mit der Durchführung beginnen.
- Führen Sie bei jedem PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle (Positive Control) und eine Negativkontrolle (Negative Control) mit.
- Lesen Sie das Protokoll vollständig durch, bevor Sie mit der Durchführung beginnen, und stellen Sie sicher, dass Sie mit der Bedienung des gewählten real-time Thermocyclers vertraut sind.
- Führen Sie das Protokoll ohne Unterbrechungen durch.

Vorbereitungen

- Alle Komponenten auf Eis auftauen lassen und vor Licht schützen.
- Während des Ansetzens der PCR die Reagenzien auf Eis halten.
- Die Reagenzien vor dem Gebrauch kurz anzentrifugieren.

Durchführung

1. 20 µl des Master-Mix in jedes Reaktionsgefäß pipettieren. Dann 5 µl der extrahierten DNA-Probe hinzugeben (Tabelle 1).

Führen Sie Positiv- und Negativkontrolle mit.

Positivkontrolle: Anstelle der DNA-Probe 5 µl der Positivkontrolle (Positive Control) einsetzen.

Negativkontrolle: Anstelle der DNA-Probe 5 µl der Negativkontrolle (Negative Control) einsetzen.

Tabelle 1. Ansetzen des Reaktionsgemisches

Komponente	Volumen
Master-Mix	20 µl
Probe	5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

2. Die Reaktionsgefäße mit den passenden Deckeln verschließen.
3. In der Software des Thermocyclers die Filter für die Reporter gemäß Tabelle 2 einstellen.

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene® Q einen festen Verstärkungswert (Gain) von +4 für den grünen Kanal und +1 für den gelben Kanal einstellen. Dies sorgt für die optimale Fluoreszenzverstärkung für den Nachweis des Pathogens und der internen Kontrolle.

Tabelle 2. Filtereinstellungen für den Reporter

Pathogen/ interne Kontrolle	Reporter
ASFV	FAM
Interne Kontrolle	HEX/ JOE™ ¹
Passive Referenz ²	ROX™

1 Verwenden Sie die für den gewählten Thermocycler geeignete Einstellung.

2 Interne Referenz für ABI PRISM® Sequence Detection Systems von Applied Biosystems®

4. Bei der Verwendung des virotype ASFV PCR Kits das in Tabelle 3 gezeigte real-time PCR-Protokoll verwenden.

Tabelle 3. Real-time PCR Protokoll für ASFV

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Aktivierung	95°C	15 min	1
2-Schritt-Cycling			
Denaturierung	95°C	15 s	40
Annealing/Extension*	60°C	60 s	

* Erfassung der Fluoreszenzdaten. PCR-Laufzeit ca. 100 min (CFX96, BioRad)

Auswertung

Interpretation der Ergebnisse

Für eine gültige Messung müssen das FAM- und das HEX-Signal der Positivkontrolle einen C_T -Wert¹ kleiner als 35 ergeben ($C_T < 35$). Die Negativkontrolle darf weder ein FAM- noch ein HEX-Signal aufweisen.

Bei der Arbeit mit unbekanntem Proben sind die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse möglich. Eine Zusammenfassung der möglichen Ergebnisse der Proben finden Sie auch in Tabelle 4 auf Seite 18.

Das Testergebnis ist positiv für ASFV und der Test ist gültig, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Die Probe zeigt ein Signal sowohl im FAM- als auch im HEX-Kanal.
- Die Positivkontrolle zeigt ein Signal sowohl im FAM- als auch im HEX-Kanal.
- Die Negativkontrolle zeigt kein Signal im FAM- und HEX-Kanal.

Bei sehr hohen Ausgangskonzentrationen an ASFV-DNA in der Probe kann es durch Konkurrenz mit der Internen Kontrolle (IC) zu einem schwächeren oder ausbleibenden HEX-Signal kommen.

¹ C_T , Threshold cycle (Schwellenzyklus) – Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert überschreitet, ab dem also erstmals ein klarer Anstieg der Fluoreszenz detektierbar ist

Das Testergebnis ist negativ für ASFV und der Test ist gültig, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Die Probe zeigt ein Signal im HEX-Kanal, jedoch kein Signal im FAM-Kanal.
- Die Positivkontrolle zeigt ein Signal sowohl im FAM- als auch im HEX-Kanal.
- Die Negativkontrolle zeigt kein Signal im FAM- und HEX-Kanal.

Die Detektion eines HEX-Signals in der Probe bedeutet, dass Extraktion und Amplifikation erfolgreich abgelaufen sind, da das Housekeeping-Gen aus der Probe amplifiziert wurde. Ist der erhaltene C_T -Wert der Internen Kontrolle allerdings größer als 35 ($C_T > 35$), so liegt möglicherweise eine partielle Inhibition der Pool- oder Einzelprobe vor. Die jeweiligen Einzelproben sollten dann verdünnt (z. B. 1:5) in Nuklease-freiem Wasser nachgetestet werden.

Eine diagnostische Aussage ist nicht möglich und der Test ist ungültig, wenn folgende Situation auftritt:

- Die Probe zeigt weder im FAM- noch im HEX-Kanal ein Signal.

Wenn weder im FAM-Kanal (Pathogen) noch im HEX-Kanal (Interne Kontrolle, IC) ein Signal detektiert wurde, ist das Testergebnis uneindeutig. Das Ausbleiben eines Signals für die interne Kontrolle weist auf eine Inhibition der PCR und/oder andere Probleme hin.

Zur Prüfung, ob eine Inhibition vorliegt, empfehlen wir, die jeweiligen extrahierten DNA-Einzelproben 1:5 in Nuklease-freiem Wasser zu

verdünnen, oder die DNA-Extraktion bzw. den gesamten Test mit frischem Probenmaterial zu wiederholen

Überprüfen Sie, ob bei der Positivkontrolle (Positive Control) im FAM-Kanal ein Fluoreszenzsignal detektiert wurde. Ein Ausbleiben des Signals für die Positivkontrolle weist auf einen Fehler hin, beispielsweise einen Fehler beim Ansetzen des Reaktionsgemisches oder eine fehlerhafte Programmierung des PCR-Gerätes.

Tabelle 4. Tabelle zur Interpretation der Ergebnisse*

Ergebnis der Probe	FAM (Pathogen)	HEX (IC)
ASFV-positiv	X	X
ASFV-positiv (stark positiv)	X	
ASFV- negativ		X
uneindeutig		

* Die Ergebnisse können entsprechend interpretiert werden, sofern Positiv- und Negativkontrolle die erwarteten Ergebnisse zeigen. Die Positivkontrolle muss ein Signal sowohl im FAM- als auch im HEX-Kanal zeigen. Die Negativkontrolle darf kein Signal im FAM- und HEX-Kanal zeigen. Eine vollständige Erklärung aller möglichen Ergebnisse der Proben finden Sie im Abschnitt „Auswertung“ ab Seite 16.

INDICAL bietet ein breites Produktportfolio zur Testung von veterinärmedizinisch relevanten Pathogenen an. Dazu gehören ELISA-Kits, qPCR-Kits und Reagenzien, Master-Mixe, Extraktionskits sowie Geräte für die automatisierte Extraktion von Nukleinsäuren.

Weitere Informationen zu den Produktlinien afosa, bactotype, cadon, cattletype, flocktype, IndiField, IndiMag, IndiMix, IndiSpin, pigtype, SVANOVIR und virotype finden Sie unter **www.indical.com**.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie in der jeweiligen Gebrauchsinformation.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarungen für den virotype ASFV PCR Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt zur Verfügung gestellten Protokollen, dieser Gebrauchsinformation und mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. INDICAL gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der in mit dem Produkt zur Verfügung gestellten Protokollen, dieser Gebrauchsinformation sowie in zusätzlichen, unter www.indical.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von Anwendern für andere Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von INDICAL nicht vollständig getestet und optimiert. INDICAL gewährt auf diese Protokolle keine Garantie und übernimmt auch keine Garantie dafür, dass sie die Rechte Dritter nicht verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt INDICAL keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. INDICAL lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. INDICAL kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihm bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines seiner geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen. Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können im Internet unter www.indical.com nachgelesen werden.

Warenzeichen/Markennamen: afosa®, bactotype®, cador®, cattletype®, flocktype®, pigtype®, Svanovir®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); ABI PRISM® (Applied Biosystems); Bio-Rad™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.); FAM™, HEX™, JOE™, ROX™ (Life Technologies Corporation); Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH). Lizenzierte Sonden sind durch Integrated DNA Technologies, Inc. hergestellt. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die in dieser Gebrauchsinformation verwendeten Markennamen oder Warenzeichen ungeschützt sind, auch wenn sie nicht als Markenname oder Warenzeichen gekennzeichnet sind.

HB-1881-DE-005 © 2018-2025 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, alle Rechte vorbehalten.

Änderungsindex

Gebrauchsinformation	Version	Änderung
HB-1881-DE-005	Mai 2025	Revision der Untersuchungsmatrizes und Extraktionskits; Löschen harmonisiertes PCR-Protokoll mit virotype CSFV RT-PCR Kit
HB-1881-DE-004	Feb 2021	Anpassung des Verwendungszwecks und Implementierung neuer Extraktionskits