

BVD-Diagnostik: die Validierung der PCR- Testsysteme an Routineproben entscheidet über den Erfolg



©: FLI

Kerstin Albrecht (LAV), Kerstin Wernike (FLI)



Intension des Vergleichs

- Bisher 96er Poole mit LAV Lysemix und RNeasy Aufreinigung
- Zwangsweise Ablösung des bisherigen Untersuchungsschemas (Wirtschaftlichkeit!)
- Neu: Schnellyse/Direktlyse und PCR 25er Poole



Vorgehen

- Ausschreibung nötig!
- Austestung im Rahmen der Ausschreibung: Qualität vor Preis!
- Kritischer Schritt: Schnell/Direktlyse (keine Zulassung erforderlich!)
- Ausführliches Versuchsschema



Versuchsplan

- Proben so „echt“ wie möglich.
- Mit „Original“ Dummystanzen wurden positive Ohren gestanzt. Von einem negativen Ohr wurden noch viel mehr negative Stanzen gestanzt um Lysate zum Verdünnen der Poole zu haben.
- Für „echte“ Versuchsbedingungen wurden die Stanzen für 1-2 Wochen im Kühlschrank bei 4°C gelagert, damit das Gewebestück maximal durchgetrocknet ist.



Versuchsplan

- Nach 1-2 Wochen wurden die Container mit dem Stanzgerät geöffnet und entsprechend der Testanweisung lysiert.
- Haltbarkeit der Lysate:
 - PCR unmittelbar nach Lyse (Tag 1)
 - nach einem Tag (Tag 2)
 - Tag 4 nach Lyse
 - Tag 7 nach Lyse

Zwischen den PCRs wurden die Lysate nach Anweisung tiefgefroren.

Gesamt: 4x Einzelproben / 3 x 25er Poole
an 4 Zeitpunkten.
für 5 kommerzielle Testkits



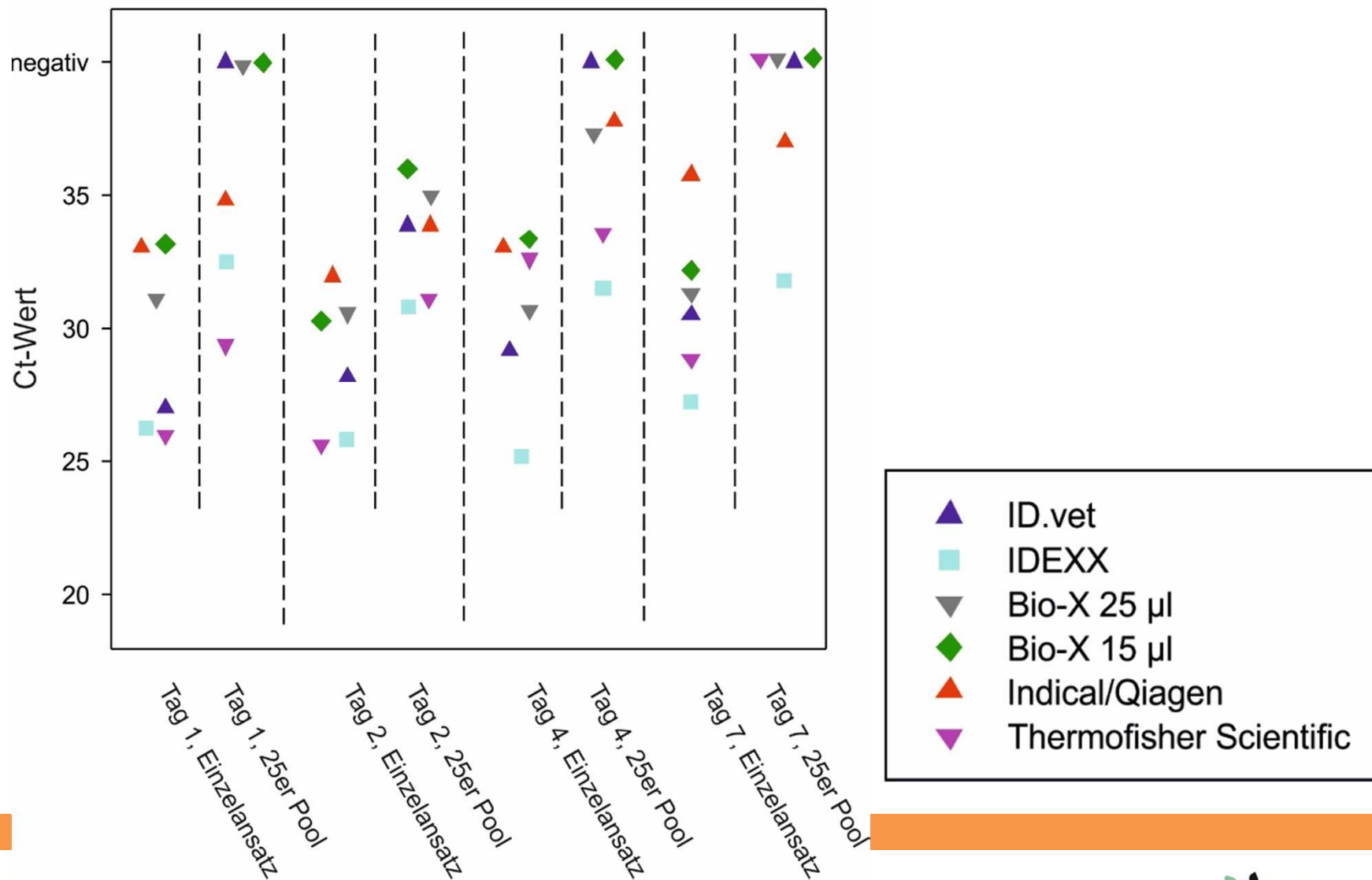
Versuchsplan

Folgende Anbieter von zugelassenen Testkits wurden verglichen:

- **Bio-X** (Adiapure TLB + ADIAVET BVD/MD REAL TIME (jeweils 15µl und 25µl Ansatz))
- **ID.vet** (Direct lysis buffer + ID Gene BVD/BD Triplex)
- **IDEXX** (Rapid Lysis Buffer + RealPCR BVDV RNA Test)
- **Indical (Qiagen)** (Tissue Lysis Reagent + *virotype* BVDV RT-PCR Kit)
- **Thermofisher Scientific** (LSI Fast Lysis Solution + LSI VetMAX BVD 4ALL)

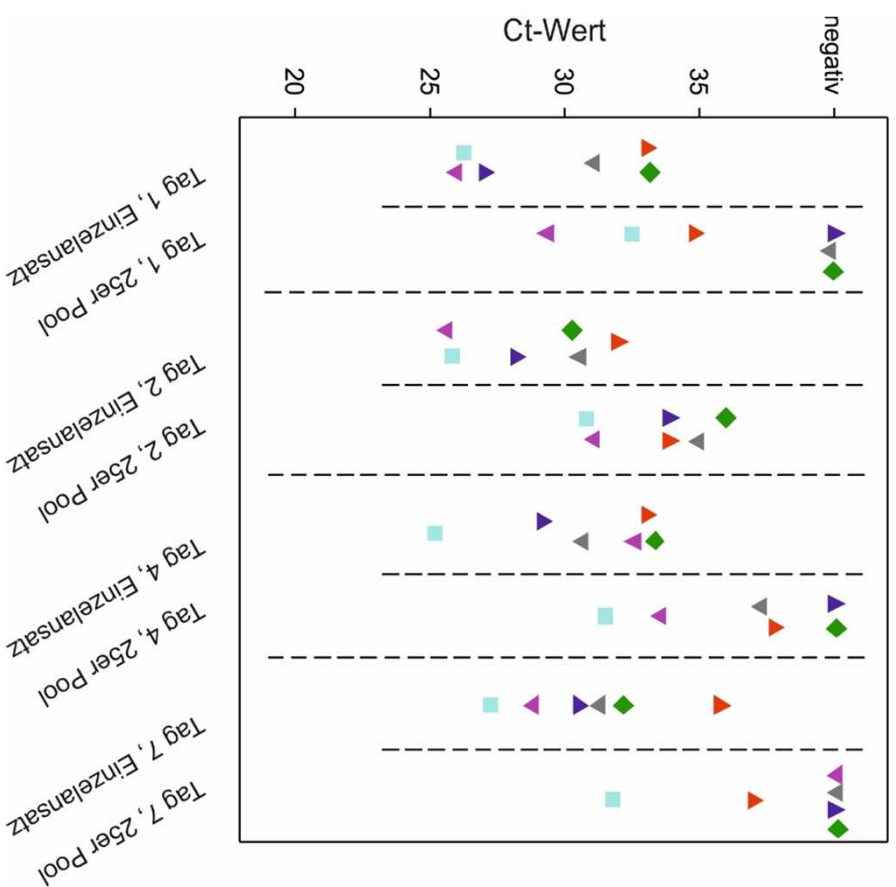


Probe 1

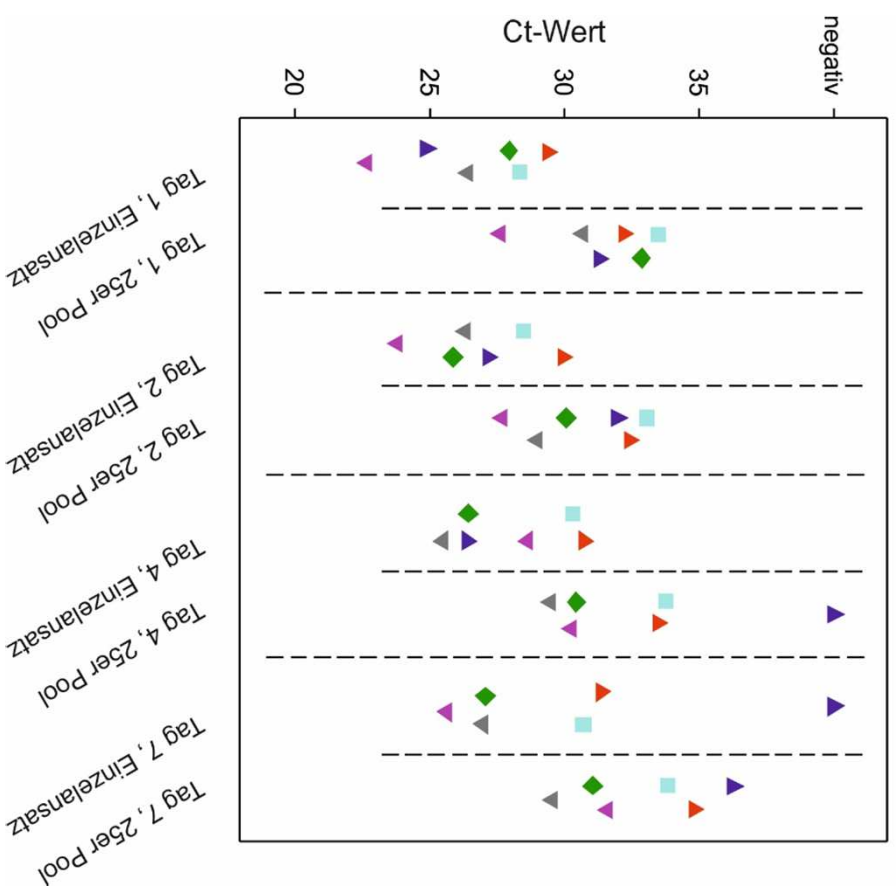


Ergebnisse

Probe 1

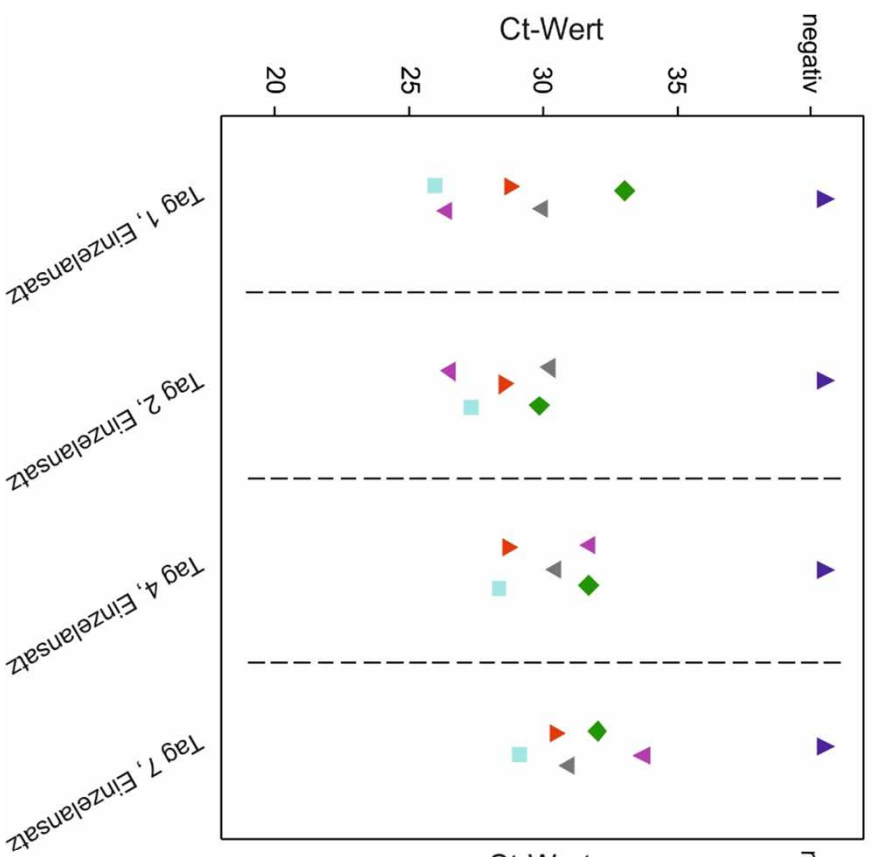


Probe 2

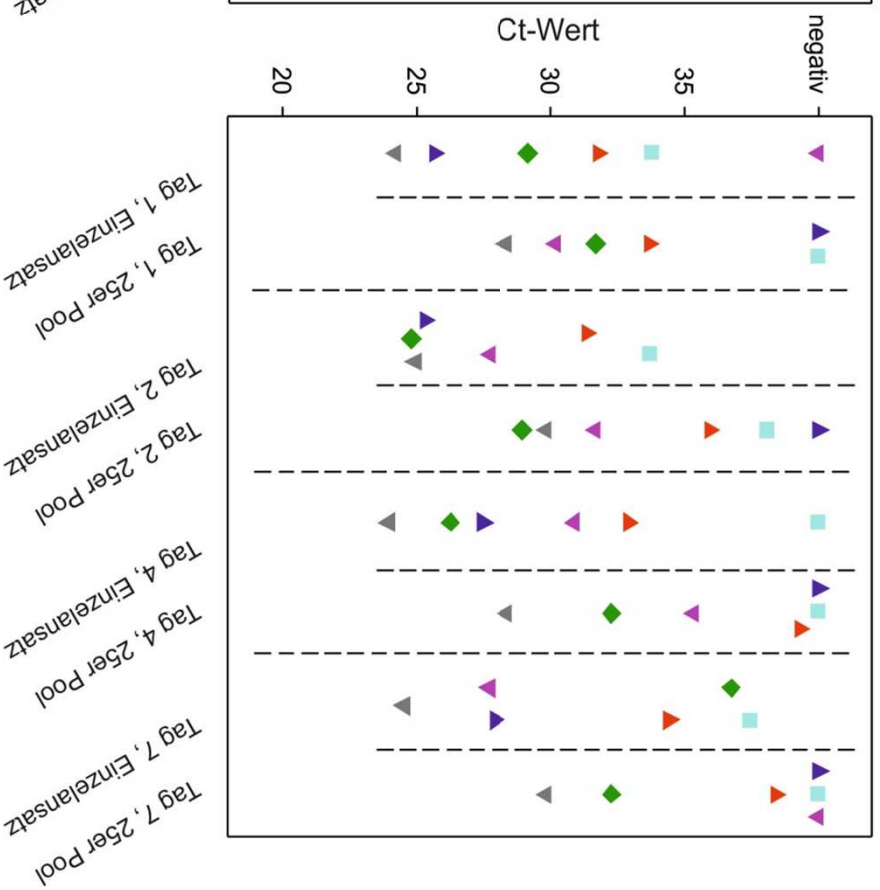


Ergebnisse

Probe 4



Probe 5



Fazit

Versuch Ausschreibung

- Nur **Indical/Qiagen** hat alle Proben zu allen Zeiten richtig erkannt.
- **Bio-X** (25µl Ansatz) hat lediglich 2 Poole (an Tag 1 und Tag 7) nicht erkannt.
- **Bio-X** (15µl Ansatz); **IDEXX** und **Thermofisher Scientific** haben jeweils 3 Proben (meist die Poolproben) nicht erkannt
- **ID.vet** hat 8 Poole und 5 Proben nicht korrekt erkannt.

Das interne Kontrollsystem hat im Versuch für alle Proben und Anbieter funktioniert.



Zweiter Versuchsteil

Haltbarkeitsversuch für 4 gut charakterisierte Ringversuchsproben

Caisley Stanzen mussten von Hand geöffnet werden.

Danach weiter entsprechend Versuch Ausschreibung

- PCR unmittelbar nach Lyse (Tag 1)
- nach einem Tag (Tag 2)
- Tag 4 nach Lyse
- Tag 7 nach Lyse

Zwischen den PCRs wurden die Lysate nach Anweisung tiefgefroren.

Gesamt: 4x Einzelproben / 3 x 25er Poole
an 4 Zeitpunkten.
für 5 kommerzielle Testkits



©: FLI

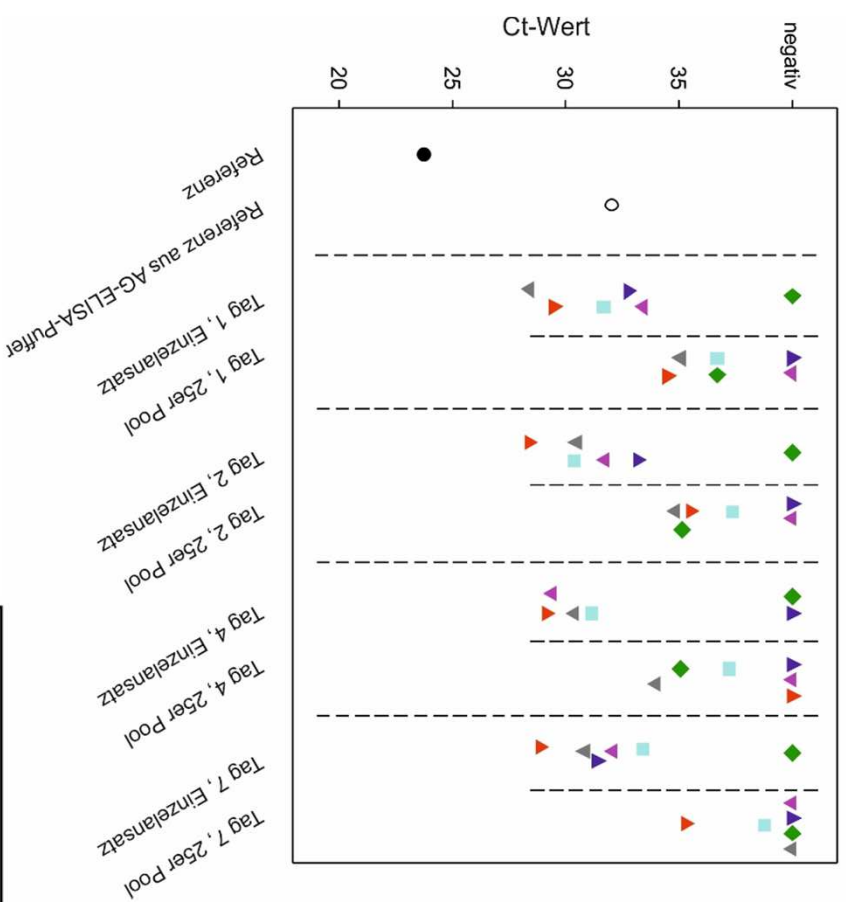


©: FLI

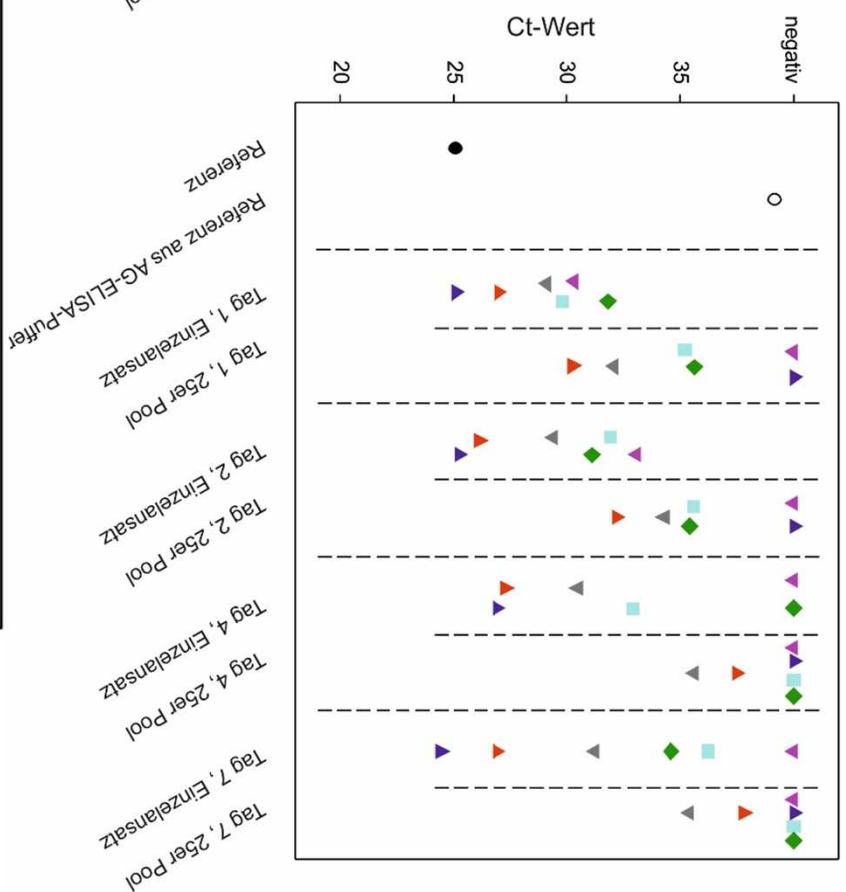


Ergebnisse

RV A11



RV A13



- RNeasy/in-house real-time PCR (FLI)
- AG-ELISA + RNeasy/in-house real-time PCR (FLI)
- ID.vet
- IDEXX
- ▲ Bio-X 25 µl
- ▲ Bio-X 15 µl
- ▲ Indical/Qiagen
- ▲ Thermofisher Scientific



SACHSEN-ANHALT
Landesamt für
Verbraucherschutz

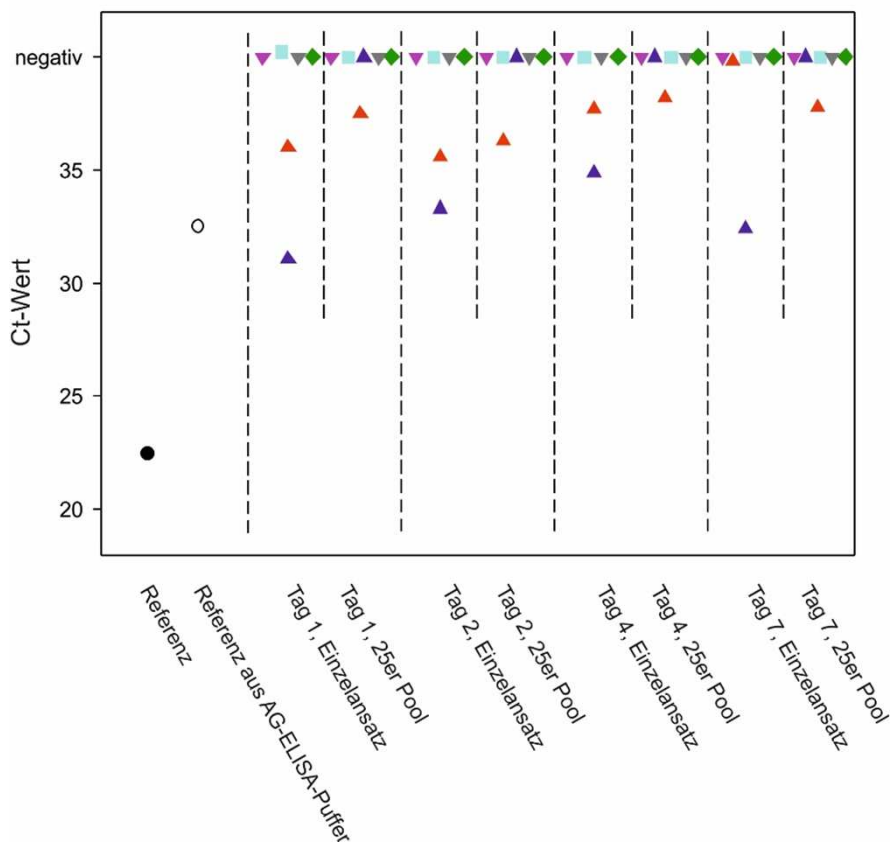
FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FILI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

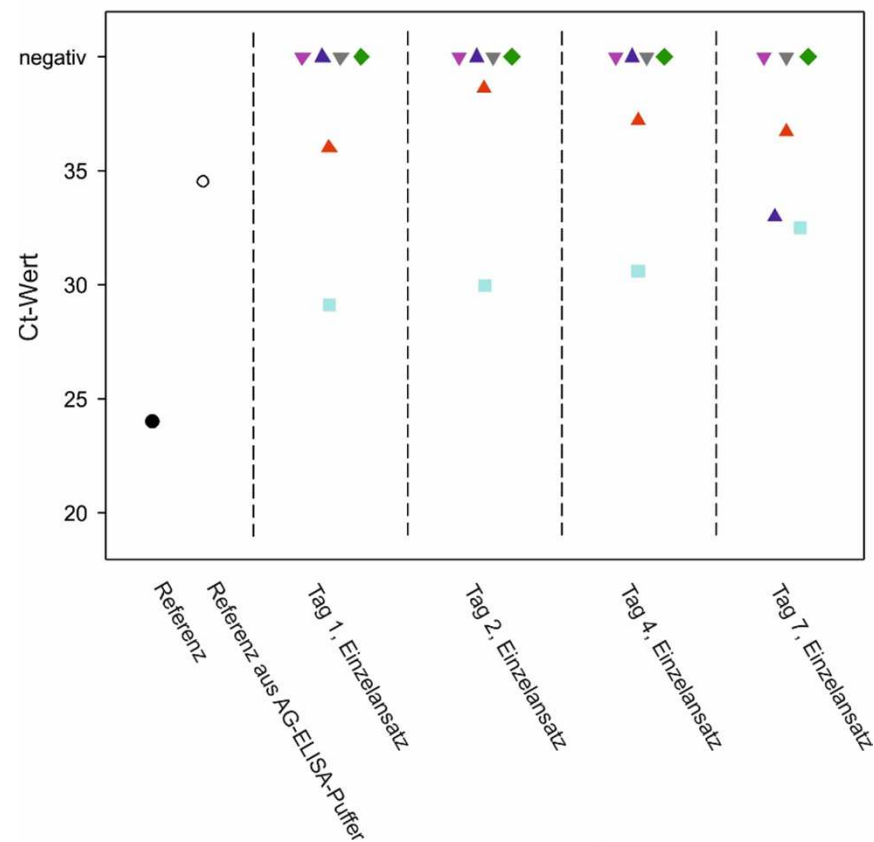


Ergebnisse

RV A12



RV A14



- RNeasy/in-house real-time PCR (FLI)
- AG-ELISA + RNeasy/in-house real-time PCR (FLI)
- ▲ ID.vet
- IDEXX
- ▼ Bio-X 25 µl
- ◆ Bio-X 15 µl
- ▲ Indical/Qiagen
- ▼ Thermofisher Scientific



Fazit

Zweiter Versuchsteil

Im zweiten Versuchsteil hatten alle Anbieter Schwierigkeiten.

A11 und A13 zum Teil annehmbare Ergebnisse.

A12 und A14 sehr viele Ausfälle.

- ☐ Kein Anbieter hat alle Proben (Einzel/Pool) erkannt!

Ursache?

Lange Probenlagerung?

„ungewohntes“ Stanzsystem?



Was dürfen Sie mitnehmen?

1. Die verschiedenen Nachweissysteme müssen zwingend! unter eigenen Laborbedingungen (inkl. Testcontainer) validiert werden.
2. Die Lysereaktion ist vermutlich die entscheidendere Stelle für die Qualität.

Update: ID.vet arbeitet intensiv an der Optimierung des Lysesystems auch für Stenzen von Hauptner-Herberholz.



Und eine Bitte zum Abschluss

Für die ELISA Nutzer:

Bitte senden sie positive Ohrstanzen zur Genotypbestimmung und Typisierung an das Nationale Referenzlabor für BVD/MD.

Diese Methoden sind auch aus Ohrstanzen im ELISA-buffer möglich!

Sie erleichtern sich selbst die Epidemiologie wenn sie positive Proben einsenden.



Vielen Dank



Gibt es Fragen?

