

ProAnimalLife - VirusDetect

Thema: „Entwicklung eines Schnelltestsystems zur Früherkennung letaler Erkrankungen bei Nutz- und Zierfischen“

FuE-Projekt: Standardisiertes Verfahren zur Probennahme und -vorbereitung sowie Validierung von Verfahrensergebnissen

Beteiligte Einrichtungen: milenia biotec GmbH, Gießen, Technische Universität Berlin, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Problem- und Zielstellung

Einige Fischkrankheiten, darunter das Koi-Herpesvirus, weisen eine sehr hohe Mortalität auf, sind praktisch nicht behandelbar und verursachen daher weltweit große Verluste in der Fischwirtschaft. Wegen ihrer großen wirtschaftlichen Bedeutung sind diese Fischseuchen melde- bzw. anzeigepflichtig und ihr Nachweis muss nach Referenzmethoden erfolgen, die in akkreditierten Laboren durchgeführt werden. Um den Nachweis deutlich zu beschleunigen und auch direkt vor Ort zu ermöglichen, sollten im Projekt ein nutzerfreundlicher Schnelltest basierend auf den Referenzmethoden und ein vereinfachter PCR-Zyklus entwickelt werden, um durch die schnellere Diagnostik auch die zeitnahe Einleitung von Maßnahmen zu ermöglichen. Aufgaben der FFG im Projekt waren die Entwicklung einer vereinfachten, standardisierten Probennahme und die Validierung der Verfahrensergebnisse.

Ergebnisse

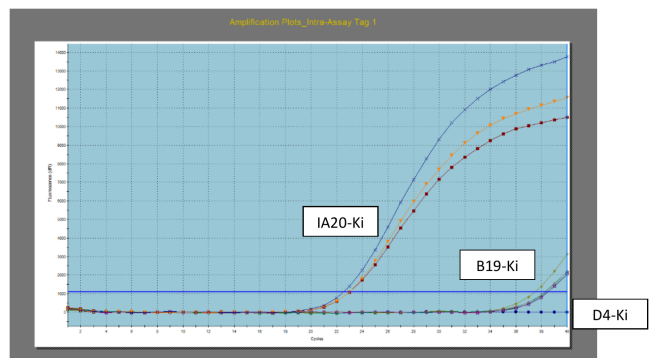
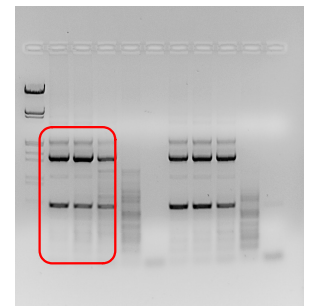
Als erstes wurde die Virenverteilung in Fischgeweben eruiert und, darauf basierend, eine praxistaugliche vor-Ort-Probennahmetechnik entwickelt sowie, durch Vergleich mit den Referenzmethoden, validiert. Als optimale Methode wurde die Entnahme von Kiemenabstrichen (Tupferproben) festgestellt. Um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden, sollten die Tupferproben entweder unverdünnt oder 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt eingesetzt werden. Die praxistaugliche Probennahmetechnik kommt ohne die übliche Laborausstattung aus und kann daher auch von eingewiesenen Laien erfolgreich durchgeführt werden.

Das vom Projektpartner neu entwickelte vereinfachte PCR-Gerät wurde evaluiert und ist in der Qualität der PCR gleichwertig zu Standard-Laborgeräten. Die Anwendung des neu entwickelten Gerätes und die Kontrollmöglichkeiten während der PCR-Zyklen waren dabei deutlich besser als bei einem Standard-Laborgerät. Auch hier ist die Handhabung durch angeleitetes Personal möglich.

Ausblick

Da es im Labor bei den Validierungen zu Carry-over-Kontaminationen kam, ist die Anwendung des neu entwickelten Testverfahrens trotz der vereinfachten Probennahmetechnik und des vereinfachten PCR-Zyklus wegen weiterer kritischer Schritte in der Probenvorbereitung durch nicht molekularbiologisch geschulte Anwender momentan nicht nutzbar. Mögliche Abhilfen wurden bereits identifiziert, müssen aber noch getestet und validiert werden. Davon abgesehen ist das Gesamtsystem jedoch für den vor-Ort-Einsatz optimiert und validiert.

Validierung neu entwickeltes PCR-Gerät (Elektrophorese der PCR-Produkte): im linken Bereich (rot markiert) die Ergebnisse des neuen PCR-Zyklus, rechts die eines Standard-Laborgerätes.



Präzision der KHV-PCR mit stark positiven (IA20-Ki), schwach positiven (B19-Ki) und negativen (D4-Ki) Proben.

Gefördert durch:



Dieses Projekt (16 KN 062342) wurde durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

www.frankenfoerder-fg.de