



Kylt®

V

Nur für *in vitro* Veterinär-Diagnostik anzuwenden.

Kylt® *Salmonella* spp.

DNA-Extraktions- und Real-Time PCR Detektionskit zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Sockentupfern, Kotproben und Stäuben von Huhn und Pute sowie in Kotproben, Rektaltupfern und Organ- und Gewebeproben von Schwein und Rind

www.kylt.eu

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

Zul-Nr. FLI-B 656

Art. Nr. 31019

Kylt® *Salmonella* spp.

Kylt® *Salmonella* spp. DNA-Extraktions- und Real-Time PCR Detektionskit

100 Reaktionen, *in vitro* Diagnostikum
für Huhn, Pute, Schwein & Rind

A. Allgemeines

- Kylt® *Salmonella* spp. DNA-Extraktions- und Real-Time PCR Detektionskit dient dem Nachweis von *Salmonella* spp. in Sockentupfern, Kotproben und Stäuben von Huhn und Pute sowie in Kotproben, Rektaltupfern und Organ- und Gewebeproben (z.B. Colonkegel und Darmlymphknoten) von Schwein und Rind.
- Kylt® *Salmonella* spp. enthält das Reagenz für die Probenaufbereitung aus Kulturmaterial sowie alle notwendigen Reagenzien und Kontrollen für die anschließende Detektion bakterieller DNA von *Salmonella* spp.: Nach bakterieller Voranreicherung und anschließender DNA-Extraktion wird ein qualitativer Nachweis von *Salmonella* spp. durch die in Echtzeit detektierte Amplifikation eines *Salmonella* spp.-spezifischen Zielgenes geführt. Auf diese Weise wird bereits wenige Stunden nach Voranreicherung das Ergebnis erzielt.
- Der qualitative Nachweis von Kylt® *Salmonella* spp. beruht auf einer duplex Real-Time PCR: In einem gemeinsamen Reaktionsansatz werden parallel durch spezifische Primerpaare die beiden Zielgene für *Salmonella* spp. bzw. für eine Interne Amplifikationskontrolle in der Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) amplifiziert. Die amplifizierten Zielgen-Fragmente werden während der laufenden PCR-Reaktion anhand fluoreszierender Sonden in Echtzeit detektiert (Echtzeit- oder Real-Time PCR). Die spezifischen Sonden für die Detektion der Zielgen-Fragmente von *Salmonella* spp. bzw. der Internen Amplifikationskontrolle sind mit den Fluoreszenz-Farbstoffen FAM bzw. HEX markiert. Die emittierte Fluoreszenz wird separat jeweils optisch durch den Real-Time PCR Thermocycler erfasst. Anhand dieser beiden unabhängigen Analysen im gleichen Reaktionsansatz je Probe sowie anhand der Negativ- und Positivkontrollen je PCR-Lauf wird ein valides, qualitatives Ergebnis zum *Salmonella* spp.-spezifischen Status der Probe erlangt.
- Kylt® *Salmonella* spp. ist von einem externen Expertenlabor nach internationalen Standards gemäß DIN EN ISO 16140 für Sockentupfer, Kotproben und Stäube von Huhn und Pute validiert (Bericht 2389, DIL - Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V.).
- Dieses Kit ist für den Gebrauch durch geschultes Laborpersonal nach standardisierten Verfahren entwickelt.

B. Reagenzien und Materialien

- Kylt® *Salmonella* spp. DNA-Extraktions- & Real-Time PCR Detektionskit enthält folgende Reagenzien:

Reagenz	Farbcode Deckel	Menge bei Kit mit 100 Reaktionen	Lagerung
DNA Extraktions-Mix II	○ weiß	1 x 20 ml	+2 °C bis +8 °C
Reaktions-Mix	● gelb	4 x 500 µl	+2 °C bis +8 °C
Positivkontrolle	● rot	2 x Lyophilisat / 2 x 20 µl rehydriert	+2 °C bis +8 °C lyophilisiert
			+2 °C bis +8 °C rehydriert (max. 2 Tage)
			-18 °C bis -20 °C rehydriert (max. 6 Monate)
Negativkontrolle	● blau	1 x 1 ml	+2 °C bis +8 °C

- Alle Reagenzien bei +2 °C bis +8 °C lagern. Den Reaktions-Mix dunkel lagern und niemals direktem Sonnenlicht aussetzen! Die Reagenzien nur bis zu dem auf dem Etikett des Umkartons angegebenen Ablaufdatum verwenden.
- Vor dem ersten Gebrauch wird die lyophilisierte Positivkontrolle rehydriert: 20 µl der Negativkontrolle zu der Positivkontrolle geben, kurz bei Raumtemperatur inkubieren und die Positivkontrolle durch wiederholtes kurzes Vortexen gründlich mischen. Eine Lagerung von Aliquots mit etwa 5 – 10 µl Volumen (abhängig von der zu erwartenden, durchzuführenden Anzahl an Positiv-Kontrollreaktionen je Kit) bei -18 °C bis -20 °C wird empfohlen.
- Dieses Kit kann auf allen handelsüblichen Real-Time PCR Thermocyclern eingesetzt werden, die die emittierte Fluoreszenz der Farbstoffe FAM (Emission um 520 nm) und HEX (Emission um 556 nm) detektieren können.
- Wir empfehlen den ausschließlichen Gebrauch von zertifiziert Nuklease-freien Verbrauchsmaterialien sowie von puderfreien Schutzhandschuhen. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen ist nach jeder Probe die Pipettenspitze zu wechseln. Die Handschuhe sind möglichst häufig zu wechseln, insbesondere nach Verschütten oder Verdacht auf anderweitige Kontamination.
- Neben dem Verbrauchsmaterial werden folgende Geräte benötigt (nicht im Kit enthalten):
 - Inkubatoren zur Probenanreicherung (+37 ± 1 °C & +41,5 ± 1 °C)
 - Tischzentrifuge
 - Trockenheizblock (+100 °C ± 3 °C)
 - Vortexer
 - Magnetrührer
 - Mikropipetten Volumenbereich 1 – 1000 µl
 - Zentrifuge für PCR-Reaktionsgefäße
 - Real-Time PCR Thermocycler

C. Kontrollreaktionen

- Die in diesem Kit enthaltene Positivkontrolle ermöglicht es, die Spezifität und Effizienz der Reagenzien und des PCR-Laufes selbst zu kontrollieren. Die in diesem Kit enthaltene Negativkontrolle ermöglicht es, den Eintrag von Kontaminationen auszuschließen. Nur wenn Positiv- und Negativkontrolle in jedem PCR-Lauf angewendet und als valide verifiziert werden, kann dieser in der abschließenden Auswertung als valide bewertet werden.
- Der Reaktions-Mix enthält eine Interne Amplifikationskontrolle in definierter Kopienzahl; sie wird in jeder einzelnen Reaktion co-amplifiziert (Fluoreszenz-Farbstoff HEX), um gegebenenfalls inhibitorische Effekte des DNA-Extrakts zu erfassen und somit richtig-negative Befunde zu verifizieren.

D. Protokoll (> siehe auch Kurzanleitung am Ende dieser Gebrauchsinformation)

- Die Gesamtmethode dieses *Salmonella* spp.-Nachweises umfasst folgende Schritte: kulturelle Voranreicherung, DNA-Extraktion, Real-Time PCR und Auswertung.

1. Kulturelle Voranreicherung

- Die Probenvorbereitung und Handhabung sollte nach Guter Laborpraxis und mit sterilen Instrumenten erfolgen, um eine mikrobielle Kontamination durch äußere Quellen zu vermeiden.

Huhn und Pute:

Das Beprobungsprotokoll und die Vorbereitung der Proben für die Laboranalyse (Ansetzen der ersten Voranreicherung) sind durch die entsprechende EU-Rechtsetzung vorgegeben. Gepoolte Sockentupfer, Teilproben von Kot oder Staub und Oberflächen-Staubsaammeltupfer werden entsprechend der einschlägigen EU-Verordnungen in gegebenem Volumen gepufferten Peptonwassers (Buffered Peptone Water, BPW) vorangereichert. Zum Beispiel müssen im Falle von Legehennen, Masthähnchen oder Mastputen je Pools von (zwei) Sockentupfer-Paaren vollständig in 225 ml BPW eingetaucht werden, ggf. ist mehr BPW beizugeben (VO (EU) Nr. 517/2011, 200/2012 bzw. 1190/2012).

Schwein und Rind:

Die Probenvorbereitung und Voranreicherung erfolgt gemäß DIN EN ISO 6579-1:2017.

Allgemein:

Um eine ausreichende Vermehrung potentiell vorhandener Salmonellen während der Inkubationszeit zu gewährleisten, muss das BPW zum Zeitpunkt des Probenansatzes mindestens auf Raumtemperatur vorgewärmt sein. Die Voranreicherung ist bei $+37 \pm 1$ °C ohne Schütteln für 18 ± 2 Stunden zu inkubieren.

- Mindestens 3 ml des Überstandes der Voranreicherung mittels steriler Einweg-Transferpipette in ein steriles Reagenzröhrchen überführen, Stomacherbeutel verwerfen.
- **Hinweis:** Die Lagerung im Reagenzröhrchen ist nur eine Empfehlung, es kann für die DNA-Extraktion auch direkt 1 ml vom Stomacherbeutel in ein konisches, steriles Schraubdeckelgefäß überführt und anschließend der Stomacherbeutel aufbewahrt werden.
- **Achtung:** Mischen der Voranreicherung nach Inkubation durch Schütteln oder sonstige Bewegung ist zwingend zu vermeiden! Keinen groben oder fettigen Debris mit überführen. Die Voranreicherung direkt aus der klareren Phase unterhalb der aufschwimmenden groben oder fettigen Bestandteile entnehmen.
- 1 ml aus dem Reagenzröhrchen in ein konisches, steriles 1,5 ml Schraubdeckelgefäß überführen. Die verbleibende Voranreicherung im Reagenzröhrchen oder Stomacherbeutel kann für eine eventuell nachfolgende kulturelle Untersuchung aufbewahrt werden.
- Für Proben, bei denen es im Anschluss an die Voranreicherung schwierig ist, Überstand ohne Debris zu überführen, können optional auch Stomacherbeutel mit Filter für die Voranreicherung in BPW benutzt werden.

- Bestimmte Probenarten, wie z.B. Torf- oder Mutterboden-haltige Sockentupfer oder Kotproben (exkl. Rektaltupfer) vom Rind mit hoher Konzentration an Huminsäuren, können potentiell zu einer Hemmung der Real-Time PCR führen. Im Falle solch einer Hemmung der Real-Time PCR wird ein zweiter Anreicherungs-schritt im Anschluss an die erste Voranreicherung durchgeführt und der gesamte Prozess der DNA-Extraktion und Real-Time PCR wiederholt (siehe auch Kapitel D.4. »Auswertung«). Alternativ kann für Proben, deren potentiell hemmender Effekt auf die Real-Time PCR bekannt ist, der zweite Anreicherungs-schritt ohne vorherige Real-Time PCR-Testung unmittelbar nach der Voranreicherung durchgeführt werden.
- Die zweite Anreicherung wird im selektiven Medium Rappaport-Vassiliadis-Soja Bouillon (RVS) durchgeführt. Die erste (fertig inkubierte) Voranreicherung (Probe in BPW) wird im Verhältnis 1:100 zur RVS gegeben (z.B. 100 µl zu 10 ml). Die zweite Anreicherung bei $+41,5 \pm 1$ °C ohne Schütteln für 5 ± 1 Stunden inkubieren.

2. DNA-Extraktion

- Heizblock auf Soll-Temperatur $+100$ °C einstellen, der Heizblock muss vor Beginn der folgenden Inkubationsschritte eine Ist-Temperatur von $+100 \pm 3$ °C erreicht haben.
- Die Voranreicherung im Schraubdeckelgefäß durch Zentrifugieren bei 10.000 g bis 12.000 g für fünf Minuten pelletieren.
- Den Überstand mit einer 1000 µl Pipettenspitze abnehmen (nicht durch Dekantieren) und verwerfen.
- Den DNA Extraktions-Mix II für den Gebrauch auf einen Magnetrührer mit niedriger Drehzahl stellen, um eine gleichmäßige Suspension des Mixes entnehmen zu können. Das Pellet gründlich in 200 µl DNA Extraktions-Mix II durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren. Dazu eine 1000 µl Pipette mit Filterspitze benutzen. Die Bildung von Aerosolen, also z. B. Blasenbildung, ist zu vermeiden.
- Den Deckel fest aufschrauben, durch gründliches Vortexen mischen und die Probe für 10 min bis 15 min bei $+100 \pm 3$ °C inkubieren.
- Durch gründliches Vortexen mischen und dann bei 10.000 g bis 12.000 g für 5 min zentrifugieren; der Überstand enthält die aufgereinigte DNA („DNA-Extrakt“) und kann sofort eingesetzt werden. Die kurzfristige Lagerung (einige Stunden) des DNA-Extrakts bei $+2$ °C bis $+8$ °C ist möglich. Für eine längerfristige Lagerung des DNA-Extrakts bei -18 °C bis -20 °C den Überstand abnehmen und in ein neues Schraubdeckelgefäß überführen. Bei -18 °C bis -20 °C gelagerte DNA-Extrakte vor erneutem Einsatz in der Real-Time PCR für wenige Minuten bei $+100$ °C ± 3 °C inkubieren, vortexen und kurz abzentrifugieren.
- **Hinweis:** Alternativ kann die DNA-Extraktion mit anderen Methoden als die im Kit enthaltene manuell oder automatisiert erfolgen. Es wird empfohlen alternative Prozesse nach Maßgabe des verantwortlichen Laborleiters und unter Beachtung des aktuellen Standes von Wissenschaft und Technik für die zu untersuchenden Matrices vergleichend zu verifizieren.

3. PCR Setup und Amplifikation

- Reaktions-Mix und Negativkontrolle vor jedem Gebrauch kurz vortexen und runter zentrifugieren.
- Die Zahl benötigter PCR-Reaktionen bestimmen: zu der Anzahl der zu untersuchenden Proben noch zwei weitere für die Positiv- und Negativkontrolle addieren.

- 18 µl des Reaktions-Mixes zu jedem PCR-Reaktionsgefäß / jeder PCR-Plattenvertiefung („Kavität“) pipettieren. Den Reaktions-Mix nur so kurz wie möglich dem Licht aussetzen.
- 2 µl Negativkontrolle zu entsprechender Kavität geben und diese verschließen.
- 2 µl des DNA-Extraktes jeder Probe zu entsprechender Kavität geben und diese verschließen. Dazu den klaren Überstand der DNA-Extraktion nehmen und dabei die Übertragung von Partikeln vermeiden.
- Erst wenn alle übrigen Kavitäten verschlossen sind, 2 µl der Positivkontrolle zu entsprechender Kavität geben und diese verschließen. Die Positivkontrolle vor jedem Gebrauch kurz vortexen und runter zentrifugieren.
- Beim Pipettieren von Reaktions-Mix, Proben und Kontrollen die Bildung von Bläschen vermeiden. In jedem Falle wird empfohlen, die Kavitäten vor dem PCR-Lauf zu zentrifugieren.
- Die Kavitäten in den Real-Time PCR Thermocycler stellen und die Amplifikation mit folgenden Parametern durchführen:

Schritt	Temperatur	Dauer
Aktivierung Polymerase	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	15 sec
Annealing & Extension	60 °C	1 min
Fluoreszenzmessung	Kanäle HEX und FAM	

} 42 Zyklen

- Beachten Sie bitte die Geräte-spezifischen Angaben des Herstellers zu Ihrem Real-Time PCR Thermocycler.
- Diese Amplifikationsparameter erlauben eine Kombination dieser Kylt® *Salmonella* spp. Real-Time PCR mit anderen Kylt® Real-Time (RT-)PCRs für den Nachweis bakterieller Erreger. Bei der Kombination von Nachweisen ist jedoch die Erfassung aller benötigten Kanäle zu beachten!

4. Auswertung

Allgemeines

- Die Daten der Amplifikationsreaktionen können automatisch mit der spezifischen Software des Real-Time PCR Thermocyclers bearbeitet werden. Alternativ kann auch manuell ein Threshold gesetzt werden, dabei ist Folgendes zu beachten. Der Threshold sollte die HEX-Kurve der Negativkontrolle bzw. die FAM-Kurve der Positivkontrolle in ihrem linearen Bereich des Anstiegs schneiden. Durch das Setzen des Thresholds ergibt dessen Schnittpunkt mit der HEX- bzw. FAM-Kurve den entsprechenden sog. „Cycle of threshold“ (Ct). Der Ct-Wert korreliert negativ mit der anfänglichen Konzentration der Zielgen-Kopien in der Real-Time PCR-Reaktion.
- Nur Kurvenverläufe mit einer typischen exponentiellen Amplifikation, d. h. die Kurve der Rohdaten zeigt zu Beginn eine flache Basislinie, gefolgt von einem deutlichen (exponentiellen) Anstieg der Fluoreszenz und gegebenenfalls dem Erreichen einer Plateau-Phase (bei logarithmischer y-Achse), sind als positiv zu werten.
- Für die Testauswertung wird zunächst anhand der Negativ- und Positivkontrollen die Validität des Laufes bestimmt. Danach wird die Validität jeder einzelnen Probe anhand der Internen Amplifikationskontroll-Reaktion bestimmt sowie ihr *Salmonella* spp.-spezifischer Status geprüft.

Testauswertung

- Der **Test** ist **nur gültig**, wenn die FAM-Kurve der Negativkontrolle negativ, die HEX-Kurve der Negativkontrolle positiv und die FAM-Kurve der Positivkontrolle positiv sind. Für einen validen Test soll der FAM-Ct-Wert der Positivkontrolle > 15 und ≤ 35 und der HEX-Ct-Wert der Negativkontrolle > 10 und ≤ 40 sein.

HEX-Kurve positiv	ja	ja	nein	nein
FAM-Kurve positiv	nein	ja	ja	nein
Die Probe ist <i>Salmonella</i> spp.	negativ	positiv	positiv	gehemmt

- Eine **Probe** ist **negativ**, wenn ihre HEX-Kurve positiv ($10 < Ct \leq 40$), aber ihre FAM-Kurve negativ ist.
- Eine **Probe** ist **positiv**, wenn ihre FAM-Kurve positiv ist ($10 \leq Ct \leq 42$), unabhängig von der HEX-Kurve.
- Eine **Probe** ist **gehemmt**, wenn weder die HEX-Kurve, noch die FAM-Kurve positiv sind.
- Empfehlung:** Im Falle einer gehemmten Probe die Voranreicherung zu RVS geben und weitere 5 ± 1 Stunden inkubieren (für Details siehe Kapitel D.1. »Kulturelle Voranreicherung«). Damit können potentiell in der ersten Voranreicherung vorhandene Inhaltsstoffe, die einen hemmenden Effekt auf die Effizienz der Real-Time PCR haben, verdünnt werden. Zudem kann eine weitere gezielte Vermehrung von potentiell vorhandenen *Salmonellae* erreicht werden. Nach Abschluss der Inkubation der zweiten Anreicherung den gesamten Prozess der DNA-Extraktion und Real-Time PCR wiederholen (siehe Kapitel D.2. »DNA-Extraktion« und D.3. »PCR Setup und Amplifikation«).
- Für einfache und zuverlässige Probendateneingabe, Start des Real-Time PCR-Laufes und finale qualitative Auswertung sowie Dokumentation empfehlen wir die Kylt[®] PCR-Software, bitte sprechen Sie uns darauf an.

Herstellung:

AniCon Labor GmbH | Mühlenstr. 13 | D-49685 Höltinghausen | www.anicon.eu | www.kylt.eu

Kylt[®] ist ein eingetragenes Warenzeichen.

Nur für Veterinärgebrauch. Nur für *in vitro*-Gebrauch. Die regulatorischen Anforderungen können je nach Verwendungsland variieren und dieses Produkt kann insoweit ggf. in Ihrer Region nicht verfügbar bzw. nicht zugelassen sein.

© 2013 - 2018 Anicon Labor GmbH. Alle Rechte vorbehalten. Die in diesem Dokument genannten Marken sind Eigentum der Anicon Labor GmbH oder der genannten Markeninhaber.

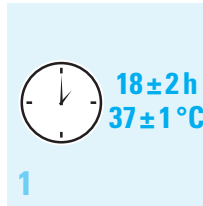
MIT DEM KAUF DIESES PRODUKTES ERHÄLT DER KÄUFER DAS RECHT ZUR VERWENDUNG DIESES PRODUKTES FÜR IN VITRO VETERINÄR-DIAGNOSTIKTESTS UNTER BESTIMMTEN ROCHE-PATENTEN. EINE ALLGEMEINE PATENT- ODER SONSTIGE LIZENZ, DIE ÜBER DIESES NUTZUNGSRECHT DES KÄUFERS DIESES PRODUKTES HINAUSGEHT, WIRD NICHT GEWÄHRT.

KURZANLEITUNG

Voranreicherung, DNA-Extraktion und Real-Time PCR

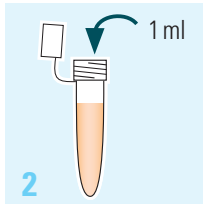
1. Voranreicherung von *Salmonella* spp.

in gepuffertem Peptonwasser
18±2 h bei 37±1 °C



2. Ernte der Bakterien

1 ml Voranreicherung überführen



3. DNA-Extraktion

3.1 10.000-12.000 g 5 min

3.2 Überstand verwerfen

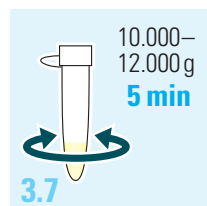
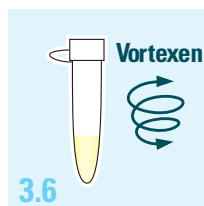
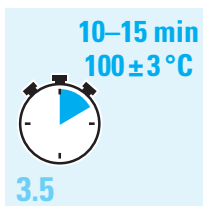
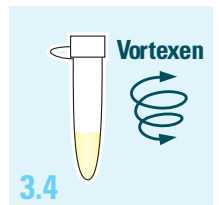
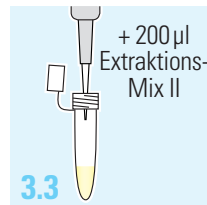
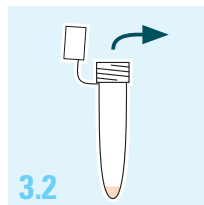
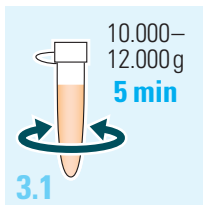
3.3 Zugabe 200 µl Extraktions-Mix II

3.4 gründlich vortexen

3.5 10-15 min bei 100±3 °C inkubieren

3.6 gründlich vortexen

3.7 10.000-12.000 g 5 min

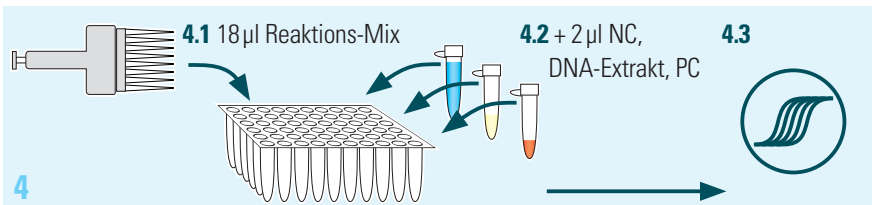


4. PCR Setup

4.1 Reaktions-Mix kurz mischen,
dann dispensieren

4.2 Zugabe von 2 µl NC, DNA-Extrakt, PC

4.3 Versiegeln, amplifizieren



5. Analyse

Threshold setzen
und Proben auswerten

