



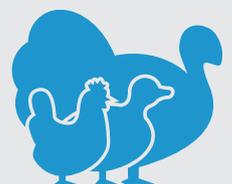
V Nur für *in vitro*
Veterinär-Diagnostik.

Kylt[®]

Kylt[®] ILT

**Real-Time PCR Detektionskit zum Nachweis des
Virus der Infektiösen Laryngotracheitis des Huhnes**

www.kylt.eu



Kylt® ILT

Real-Time PCR Detektionskit zum Nachweis des Virus der Infektiösen Laryngotracheitis des Huhnes

Revision	Stand	Beschreibung der Änderungen
Rev004	Jun 2023	Änderung des Firmennamen, Geändertes Layout für die Auswertung der Kontrollreaktionen, Ergänzungen in "E. Ähnliche und ergänzende Produkte"

A. Allgemeines

- Kylt® ILT qPCR dient dem spezifischen Nachweis von viraler DNA des Infektiösen Laryngotracheitis Virus (ILT, GaHV-1). Das Produkt ist geeignet für die Analyse von Proben der Tierart Huhn, wie Tupfer, Exsudate, Geschabsel und Gewebe von Organen wie Trachea, Lunge, Kehlkopf und Augenlid und deren Schleimhautläsionen sowie Probenmaterial kultureller Anzuchten (z.B. Chorio-Allantoismembran) der vorgenannten Proben.
- Der qualitative Nachweis mit Kylt® ILT qPCR basiert auf einer duplex Real-Time PCR: In einem gemeinsamen Reaktionsansatz werden parallel durch spezifische Primerpaare die beiden Zielgene für Infektiöses Laryngotracheitis Virus sowie für die endogene Kontrolle 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 (Real-Time PCR). Die spezifischen Sonden für die Detektion der amplifizierten Zielgen-Fragmente von ILT bzw. der Internen Kontrolle 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 Positivkontrolle je Lauf wird ein valides, qualitatives Ergebnis zum ILT-spezifischen Status der Probe erlangt. Auf diese Art können innerhalb weniger Stunden nach Eingang der Probe Ergebnisse erhalten werden.
- Das Kit wurde für den Gebrauch durch geschultes Laborpersonal nach standardisierten Verfahren entwickelt. Dieser Gebrauchsinformation ist strikt zu folgen.

B. Reagenzien und Materialien

- Kylt® ILT qPCR enthält die folgenden Reagenzien:

Reagenz	Deckel Farbcode	Menge bei Kit mit 100 / 25 Reaktionen	Lagerung
Reaktions-Mix	● grün	4 x / 1 x 450 µl	≤ -18 °C
Positivkontrolle	● rot	4 x / 2 x Lyophilisat (à final 50 µl)	≤ -18 °C
Negativkontrolle	● blau	1 x 1 ml	≤ -18 °C

- Umgehend nach Erhalt sind das Kit und seine Komponenten bei ≤ -18 °C zu lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen des Kits oder der Komponenten ist zu vermeiden. Reagenzien sollten so kurz wie möglich im aufgetauten Zustand verbleiben. Bei regelmäßiger Untersuchung nur weniger Proben sollten entsprechende Aliquots der Reagenzien vor der Lagerung bei ≤ -18 °C vorbereitet werden. Die Aliquots des Reaktions-Mixes sollten so dosiert werden, dass sie nicht mehr als dreimal eingefroren und aufgetaut werden. Die Negativkontrolle kann alternativ bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden. Für weitere Informationen bezüglich der empfohlenen Lagertemperatur ist das Etikett auf dem jeweiligen Reaktions-Mix zu beachten.
- Das Kit und seine Bestandteile sind bei vorschriftsgemäßer Lagerung bis zu dem angegebenen Ablaufdatum verwendbar (siehe Etikett des Umkartons). Die Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen nicht miteinander vermischen.
- Vor dem ersten Gebrauch wird die lyophilisierte Positivkontrolle rehydriert: 50 µl der Negativkontrolle zu jedem Tube der Positivkontrolle geben, kurz bei Raumtemperatur inkubieren und die Positivkontrolle durch wiederholtes kurzes Vortexen gründlich mischen. Eine Lagerung von Aliquots mit geeigneten Volumina bei ≤ -18 °C wird empfohlen.
- Den Reaktions-Mix dunkel lagern und nicht dem direkten (Sonnen-)Licht aussetzen.

C. Nicht enthaltene Ausstattung und Reagenzien

- Diese Detektionsmethode kann auf allen handelsüblichen Real-Time PCR Thermocyclern eingesetzt werden, die die emittierte Fluoreszenz der Farbstoffe FAM und HEX (Emission von 520 und 550 nm) erfassen. Bitte beachten: die standardmäßige Normalisierung gegen ROX (z.B. bei ABI Cyclern) muss deaktiviert werden.
- Neben dem Verbrauchsmaterial werden folgende Geräte benötigt, die nicht in Kylt® ILT qPCR enthalten sind:
 - DNA-Extraktionskit / -protokoll (z.B. Kylt® RNA / DNA Purification)
 - Tischzentrifuge
 - Vortexer
 - Mikropipetten, geeignet für Volumina von 1 µl bis 1000 µl
 - Zentrifuge für PCR-Reaktionsgefäße und -platten
 - Real-Time PCR Thermocycler
- Ergänzende Kylt® Produkte: Kapitel F "Ähnliche und Ergänzende Produkte".
- Wir empfehlen den ausschließlichen Gebrauch von zertifiziert Nuklease-freien Verbrauchsmaterialien sowie von puderfreien Schutzhandschuhen. Handschuhe sind während des gesamten Arbeitsprozesses zu tragen. Die Handschuhe sind möglichst häufig zu wechseln, insbesondere nach Verschütten oder bei Verdacht auf anderweitige Kontaminationen.

D. Kontrollreaktionen

- Die Positivkontrolle ermöglicht es, die Spezifität und Effizienz der Reagenzien und des PCR-Laufes selbst sowie die einwandfreie Funktion der Real-Time PCR und des Real-Time PCR Thermocyclers zu kontrollieren.
- Die Negativkontrolle ermöglicht es, den Eintrag von Kontaminationen auszuschließen. Nur wenn sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle in jedem PCR-Lauf angewendet und als valide verifiziert werden, kann der gesamte Lauf in der abschließenden Auswertung als valide bewertet werden.
- Die Interne Kontrolle basiert auf der Detektion einer endogenen Kontrolle, welche ubiquitär in den Zellen des Wirtes vorkommt, aus dem die Probe stammt. Die endogene Kontrolle wird in jeder einzelnen Reaktion coamplifiziert (Kanal HEX) und erlaubt die Evaluation der Probenahme, Probenlagerung und -transport, Probenvorbereitung und der Real-Time PCR selbst.

E. Protokoll *(siehe auch Kurzanleitung am Ende dieser Gebrauchsinformation)*

- Die Gesamtmethode des Nachweises umfasst folgende Schritte:
 1. Probenvorbereitung
 2. DNA Aufbereitung
 3. Reaktions-Setup und Amplifikation (Real-Time PCR)
 4. Auswertung – Validität und Qualitatives Ergebnis
- Es wird empfohlen, das Protokoll ohne Unterberechnung zu befolgen, um eine potentielle Degradierung der vorbereiteten Proben und Reagenzien zu vermeiden. Wenn erforderlich, können fertige DNA Präparationen bei $\leq -18\text{ °C}$ oder $\leq -70\text{ °C}$ gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der DNA Präparationen sollte vermieden werden.

1. Probenvorbereitung

- Das Kit ist validiert für eine Poolung von bis zu 5 Proben.
- Tupfer sollten in einem ausreichend großen Volumen sterilen Puffers (z.B. 1 ml Kochsalzlösung oder 0,1 x TE) genügend lange eingeweicht und anschließend durch gründliches Vortexen gewaschen werden.
- Der ausgewaschene Überstand wird für die DNA Aufbereitung genutzt.
- Kleine Tupfer können direkt in Lysepuffer getränkt werden.
- Gewebe- und Organproben werden gründlich in sterilem Puffer (siehe oben) homogenisiert und ein ausreichendes Volumen wird für die DNA Aufbereitung genutzt.
- Material aus kultureller Voranreicherung, z.B. Zellkulturüberstand oder Chorioallantois-Membran (CAM), kann direkt für die DNA Aufbereitung verwendet werden.

2. DNA Präparation

a) Kylt® DNA Präparation (mit Hilfe der Kylt® RNA / DNA Purification Produkte)

- Detaillierte Informationen sind den Gebrauchsanweisungen für die Kylt® RNA / DNA Purification Produkte zu entnehmen, siehe auch Kapitel F "Ähnliche und Ergänzende Produkte".

b) DNA Präparation mit anderen Methoden

- Andere Kits oder Hausmethoden können zur DNA Präparation verwendet werden, solange die Qualität eine ausreichende Amplifikation und Detektion der Internen Kontroll-DNA ermöglicht.

3. PCR Setup und Amplifikation

- Reaktions-Mix und Negativkontrolle werden vor jedem Gebrauch kurz durch Vortexen gemischt und zentrifugiert.
- Zu Beginn wird die Zahl benötigter PCR-Reaktionen bestimmt: zu der Anzahl der zu untersuchenden Proben werden zwei weitere Reaktionen für die Negativkontrolle und die Positivkontrolle addiert.
- Der enthaltene Reaktions-Mix muss nicht weiter vorbereitet werden. 16 µl werden zu jedem PCR-Reaktionsgefäß oder in jede PCR-Plattenvertiefung ("Kavität") gegeben.
- Der Reaktions-Mix sollte (Sonnen-)Licht möglichst nur kurz ausgesetzt werden und sofort wieder bei der richtigen Temperatur gelagert werden. Eine Blasenbildung sollte beim Pipettieren von Reaktions-Mix, Proben und Kontrollen vermieden werden.
- 4 µl der Negativkontrolle werden in die entsprechende Kavität gegeben und nach Möglichkeit einzeln verschlossen.
- 4 µl der aufbereiteten DNA werden in die entsprechenden Kavitäten gegeben und nach Möglichkeit einzeln verschlossen.
- Um Kontaminationen zu vermeiden, werden als letztes, nachdem alle Proben und Kontrollreaktionen vorbereitet wurden, 4 µl der Positivkontrolle in die entsprechende Kavität gegeben. Vor jedem Gebrauch sollte die rehydrierte Positivkontrolle kurz gemischt und zentrifugiert werden (vgl. Kapitel B "Reagenzien und Materialien").
- Sofern noch nicht geschehen, werden alle Kavitäten verschlossen. In jedem Fall wird empfohlen, die Kavitäten vor dem PCR-Lauf zu zentrifugieren.
- Die Platte wird in den Real-Time PCR Cyclus gestellt und die Amplifikation mit dem Kylt® Profil II wie unten angegeben gestartet.

Kylt® Profil II				
Schritt	Beschreibung	Temperatur	Dauer	
1	Aktivierung der Polymerase	95 °C	10 min	
2	Denaturierung	95 °C	15 sec	} 42 Zyklen
3	Annealing & Extension	60 °C	1 min	
4	Fluoreszenzmessung	Kanäle FAM und HEX		

- Kylt® Profil II ermöglicht die Kombination von Läufen dieser und der meisten anderen Kylt® qPCR Detektionsmethoden.
- Alternativ kann das unten angegebene Kylt® Profil I verwendet werden, um dieses und weitere Kylt® qPCR Detektionsmethoden mit Kylt® RT-qPCR Detektionsprodukten zu kombinieren, die eine Reverse Transkription zur Detektion viraler RNA beinhalten.

Kylt® Profil I				
Schritt	Beschreibung	Temperatur	Dauer	
1	Reverse Transkription	50 °C	10 min	
2	Aktivierung der Polymerase	95 °C	1 min	
3	Denaturierung	95 °C	10 sec	} 42 Zyklen
4	Annealing & Extension	60 °C	1 min	
5	Fluoreszenzmessung	Kanäle FAM und HEX		

- Bei einem kombinierten Real-Time (RT)-PCR Lauf muss sichergestellt werden, dass alle nötigen Kanäle detektiert werden.
- Bitte beachten Sie die Geräte-spezifischen Angaben des Herstellers zu Ihrem Real-Time PCR Thermocycler.

4. Auswertung – Validität und Qualitatives Ergebnis

Allgemeines

- Die Daten der Amplifikationsreaktionen können automatisch mit der spezifischen Software des Real-Time PCR Thermocyclers verarbeitet werden. Alternativ kann auch manuell ein Threshold gesetzt werden, dabei ist folgendes zu beachten: Der Threshold sollte die FAM-Kurve und die HEX-Kurve im Bereich des linearen Anstiegs schneiden (logarithmische Skalierung der y-Achse). Durch das Setzen der Thresholds ergeben dessen Schnittpunkte mit der HEX- und der FAM-Kurve die entsprechenden sogenannten "Cycle Thresholds" (Ct), die negativ mit der anfänglichen Konzentration der Zielgen-Kopien in der Real-Time PCR-Reaktion korrelieren.
- 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 Skalierung der y-Achse), sind als positiv zu bewerten.
- Für die Testauswertung wird zunächst die Validität des Laufes bestimmt. Danach wird die Validität der einzelnen Proben mit Hilfe der Internen Amplifikations-Kontrolle anhand des zugehörigen Kanals (HEX) bestimmt. Schlussendlich wird der ILT-spezifische Status jeder Probe analysiert (FAM).

Testauswertung - Kontrollreaktionen

- Der **Real-Time RT-PCR-Lauf** ist nur dann **valide** wenn die Kurven der Kontrollreaktionen wie folgt ausgewertet werden können:

Kontrollreaktionen	Signal	
	HEX	FAM
Negativkontrolle	negativ	negativ
Positivkontrolle	positiv	positiv

- Die FAM- und HEX-Ct-Werte der Positivkontrolle sollten > 15 und ≤ 35 sein

Testauswertung - Proben

Ziel	Kanal	Signal		
Interne Kontrolle	HEX	positiv	positiv / negativ	negativ
ILT	FAM	negativ	positiv	negativ
Die Probe ist ILT		negativ	positiv	gehemmt

- Eine **Probe** ist **negativ für ILT**, wenn ihre HEX-Kurve positiv ($Ct \leq 40$), aber ihre FAM-Kurve negativ ist.
- Eine **Probe** ist **positiv für ILT**, wenn ihre FAM-Kurve positiv ist ($Ct \leq 42$), unabhängig von der HEX-Kurve.
- Eine **Probe** ist **gehemmt**, wenn weder ihre FAM-Kurve noch ihre HEX-Kurve positiv ist.
- Der rekombinante Impfstoff Innovax® ILT (MSD) ist mit Kylt® ILT qPCR nicht nachweisbar. Positive Ergebnisse sind also immer auf eine Feldinfektion zurückzuführen, sofern ausschließlich dieser rekombinante Impfstoff und keine klassischen Lebendimpfstoffe eingesetzt wurden.
- Einfache und zuverlässige Dateneingabe zu den Proben, Start des Real-Time PCR-Laufes sowie anschließende qualitative Proben-Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse kann mittels der Kylt® Software vorgenommen werden.

F. Ähnliche und Ergänzende Produkte

Produkt	Artikel Nr.	Inhalt	Beschreibung
Kylt® RNA / DNA Purification	31315	50	Kombinierte Aufreinigung von RNA und DNA aus Veterinärproben.
Kylt® RNA / DNA Purification HTP	31826	4 x 96	Kombinierte, Magnetic-Beads-basierte Aufreinigung von RNA und DNA aus Veterinärproben, geeignet für automatisierte Hochdurchsatzprozesse. Geeignet für Kylt® Purifier und Kylt® Purifier 48.
Kylt® Purifier	31436	1	Gerät zur automatisierten, auf magnetischen Beads basierenden Aufreinigung von RNA und / oder DNA. Bis zu 96 Proben in unter 30 Minuten. Vorgesehen für Labore mit hohem Durchsatz.
Kylt® Purifier 48	31748	1	Gerät zur automatisierten, auf magnetischen Beads basierenden Aufreinigung von RNA und / oder DNA. Bis zu 48 Proben in unter 30 Minuten. Vorgesehen für Labore mit wenig bis mittlerem Durchsatz.
Kylt® Purifier Spin Tips	31434	5	Platte mit 96 separaten Spin Tips zum Mischen im Kylt® Purifier. Eine Platte pro Lauf wird benötigt. Ausreichend für 480 Proben. Eine Platte pro Lauf wird benötigt.
Kylt® Purifier Plates	31435	20	Platten für die verschiedenen Reagenzien im Aufreinigungskit. 4-5 Platten pro Lauf werden benötigt. Ausreichend für 320 bis 480 Proben (je nach Gerät und Protokoll).

Produktion:

SAN Group Biotech Germany GmbH | Mühlenstr. 13 | 49685 Hoeltinghausen | Germany
www.kylt.eu | kylt-de@san-group.com

Entwicklung, Herstellung und Vertrieb von Kylt® In-Vitro Diagnostika ist ISO 9001:2015 zertifiziert.

Kylt® ist ein eingetragenes Warenzeichen.

Nur für Veterinärgebrauch. Nur für *in vitro*-Gebrauch. Die regulatorischen Anforderungen können je nach Land variieren, dadurch sind ggf. nicht alle beschriebenen Produkte in Ihrer Region erhältlich.

© 2023 SAN Group Biotech Germany GmbH. Alle Rechte vorbehalten. Die in diesem Dokument genannten Marken sind Eigentum der SAN Group Biotech Germany GmbH bzw. der entsprechenden Markeninhaber.

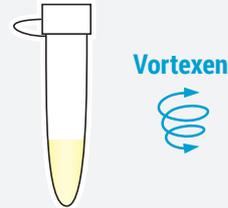


KURZANLEITUNG

Kylt® ILT qPCR Real-Time PCR Setup

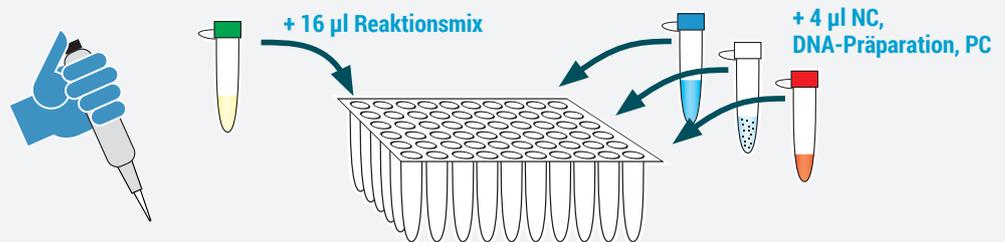
1

- 1.1 Reaktions-Mix bei Bedarf auftauen
- 1.2 Vortexen und zentrifugieren



2

Reaktionsmix dispensieren und 4 µl NC, DNA-Präparat, PC zugeben



3

Versiegeln, zentrifugieren (empfohlen), Thermocycler starten



4

Analyse

