



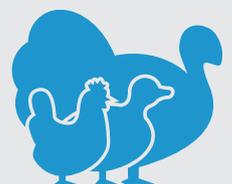
V Nur für *in vitro*
Veterinär-Diagnostik.

Kylt[®]

Kylt[®] IBDV Screening RT-qPCR

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

www.kylt.eu



Art. Nr. 31477 / 31478 (100 / 25 Reaktionen)

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

Zulassungsnummer: FLI-C 100

Kylt® IBDV Screening RT-qPCR

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

A. Allgemeines

- Kylt® IBDV Screening RT-qPCR dient dem spezifischen Nachweis von viraler RNA des Virus der Infektiösen Bursitis des Huhnes (IBDV, Gumboro). Das Produkt ist geeignet für die Analyse von Proben aus Geflügel, wie Gewebe und Organe (z. B. Bursa Fabricii, Milz, lymphatisches Gewebe), Tupferproben der zuvor genannten Gewebe und Organe und Probenmaterial kultureller Anzuchten der vorgenannten Proben.
- Der qualitative Nachweis mit Kylt® IBDV Screening RT-qPCR basiert auf einer duplex Real-Time RT-PCR: In einem gemeinsamen Reaktionsansatz werden parallel durch spezifische Primerpaare die Zielgene für IBDV sowie für die endogene Kontrolle (beta-Actin RNA) 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 RT-PCR). Die spezifischen Sonden für die Detektion der amplifizierten Zielgen-Fragmente von IBDV 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 IBDV-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® IBDV Screening RT-qPCR enthält die folgenden Reagenzien:

Reagenz	Deckel Farbcode	Menge bei Kit mit 100 / 25 Reaktionen	Lagerung
2x RT-qPCR-Mix	○ transparent	4 x / 1 x 280 µl	≤ -18 °C
Detektions-Mix	● violett	4 x / 1 x Lyophilisat (à final 150 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 Detektions-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.
- 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.
- Der Detektions-Mix muss dunkel gelagert werden und sollte nicht direktem (Sonnen-)Licht ausgesetzt werden. Vor dem ersten Gebrauch wird der lyophilisierte Detektions-Mix rehydriert: Je 150 µl der Negativkontrolle werden zu einem Lyophilisat des Detektions-Mixes gegeben, für kurze Zeit inkubiert und durch kurzes Puls-Vortexen gemischt. Eine Lagerung in entsprechenden Aliquots bei ≤ -18 °C wird empfohlen.
- Die Reagenzien sind geeignet, ein größeres Volumen eines Arbeits-Master-Mixes vorzubereiten und zu nutzen, siehe auch den 4. Absatz in Kapitel 3 "Reaktions-Setup, Reverse Transkription und Amplifikation" in Abschnitt E. "Protokoll".
- Vor dem ersten Gebrauch, wird die Positivkontrolle rehydriert: je 50 µl der Negativkontrolle werden zu einem Lyophilisat gegeben, für kurze Zeit inkubiert und durch kurzes Puls-Vortexen gemischt. Eine Lagerung in entsprechenden Aliquots bei ≤ -18 °C wird empfohlen.

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® IBDV Screening RT-qPCR enthalten sind:
 - RNA-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 siehe 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 RT-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 von beta-Aktin RNA, welche ubiquitär in den Zellen des Wirtes vorkommt aus dem die Probe stammt. Die beta-Aktin RNA wird in jeder einzelnen Reaktion revers transkribiert und coamplifiziert (Kanal HEX) und erlaubt die Evaluation der Probenahme, Probenlagerung und -transport, Probenvorbereitung und der Real-Time RT-PCR selbst.
- Es wird empfohlen eine oder mehrere RNA-Isolationskontrollen (RIC) je RNA-Präparationsvorgang, abhängig von der Gesamtanzahl an Proben eines Durchganges, zu verwenden. Die RIC sollte nur aus dem sterilen Puffer bestehen, der auch zur Probenvorbereitung verwendet wird. Die RIC wird wahllos zwischen die Proben eingereiht, wie eine normale Probe behandelt und ermöglicht eine Detektion potentieller Kontaminationen der verwendeten Reagenzien (zusätzlich zur Negativkontrolle) ebenso wie eine Detektion möglicher Kreuzkontaminationen / Verschleppung zwischen individuellen Proben während der RNA-Präparation.

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

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

1. Probenvorbereitung

- Es wird empfohlen, maximal fünf Proben oder aber Proben von fünf Einzeltieren je RNA Aufbereitung zu poolen.
- 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 RNA Aufbereitung genutzt.
- Gewebe- und Organproben werden gründlich in sterilem Puffer (siehe oben) homogenisiert und ein ausreichendes Volumen wird für die RNA Aufbereitung genutzt.
- Material aus kultureller Voranreicherung, z.B. Zellkulturüberstand oder Allantoisflüssigkeit, kann direkt für die RNA Aufbereitung verwendet werden.

2. RNA Präparation

a) Kylt® RNA 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) RNA Präparation mit anderen Methoden

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

3. Reaktions-Setup, Reverse Transkription und Amplifikation

- Vor jedem Gebrauch sollte der 2x RT-qPCR-Mix und der rehydrierte Detektions-Mix (siehe auch Kapitel B „Reagenzien und Materialien“) kurz gevortext und abzentrifugiert werden.
- Zur Bestimmung der Gesamtzahl benötigter Reaktionen wird die Anzahl der zu untersuchenden Proben (inklusive RIC(s), wenn durchgeführt) plus zwei weitere Ansätze für die Negativ- und IBDV Screening RT-qPCR-Positivkontrolle gezählt.
- Der Master-Mix wird aus 2x RT-qPCR-Mix und IBDV Screening RT-qPCR-Detektions-Mix für die entsprechende Anzahl an Reaktionen vorbereitet. Je PCR-Plattenvertiefung / Kavität werden 16 µl Master-Mix vorgelegt. Die Real-Time RT-PCR wird in folgender Reihenfolge angesetzt:

Reagenz	Volumen (µl)	
	pro Reaktion	z.B. n=7
2x RT-qPCR-Mix	10 µl	70 µl
IBDV Screening RT-qPCR-Detektions-Mix	6 µl	42 µl
Total Master-Mix	16 µl	112 µl 16 µl pro Reaktion vorlegen
RNA (Negativkontrolle / Probe (/ RIC) / Positivkontrolle)	4,0 µl	
Total Reaktion	20,0 µl	

- **Alternativ kann auch ein größeres Volumen eines einsatzfertigen Arbeits-Master-Mixes vorbereitet werden. Dieser Arbeits-Master-Mix kann für mind. sechs Monate bei ≤ -18 °C gelagert werden. Der Arbeits-Master-Mix sollte so aliquotiert sein, dass er im Gebrauch nicht mehr als drei Frier-Tau-Zyklen ausgesetzt wird.**
- Es ist darauf zu achten, den 2x RT-qPCR-Mix und IBDV Screening RT-qPCR-Detektions-Mix nur so kurz wie möglich dem (Sonnen-)Licht auszusetzen und beide Reagenzien nach der Verwendung sofort wieder bei ≤ -18 °C zu lagern. Eine Blasenbildung während des Pipettierens von Master-Mix, Proben und Kontrollen ist zu vermeiden.
- 4 µl der Negativkontrolle werden zur entsprechenden Kavität gegeben und diese, wenn möglich, einzeln verschlossen.
- 4 µl der Proben-RNA (finale RNA-Präparationen – inklusive RIC(s), wenn durchgeführt) werden zur entsprechenden Kavität gegeben und diese, wenn möglich, einzeln verschlossen.

- Zur Risikominimierung potentieller Kreuzkontaminationen werden 4 µl der IBDV-Positivkontrolle erst nach Zugabe aller Proben und Kontrollen in die entsprechende Kavität gegeben. Vor jedem Gebrauch die rehydrierte IBDV-Positivkontrolle (siehe auch Kapitel B „Reagenzien und Materialien“) kurz vortexen und abzentrifugieren.
- Wenn nicht bereits vorher geschehen, werden zum Schluss alle Kavitäten verschlossen. In jedem Fall wird empfohlen, die Kavitäten vor dem Start des Real-Time RT-PCR-Laufes zu zentrifugieren.
- Die Kavitäten werden anschließend in den Real-Time PCR Thermocycler gestellt und der Test mit folgenden Parametern durchgeführt:

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 cycles
4	Annealing & Extension	60 °C	1 min	
5	Fluoreszenzmessung	Kanäle FAM und HEX		

- Kylt® Profil I ermöglicht die Kombination von Läufen dieser und den meisten anderen Kylt® RT-qPCR Detektionsmethoden sowie qPCR Detektionsprodukten.
- Bei einem kombinierten Real-Time (RT)-PCR Lauf muss unbedingt sichergestellt werden, dass alle benötigten 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, 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 IBDV-spezifische Status jeder Probe analysiert (FAM).

Testauswertung - Kontrollreaktionen

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

Kontrollreaktionen	Kanal	
	HEX	FAM
Negativkontrolle	negativ	negativ
Positivkontrolle	positiv	positiv

- Für einen validen Test sollten die Ct-Werte der Positivkontrolle zwischen > 15 and ≤ 35 liegen.
- Die HEX-Kurve der Negativkontrolle ist negativ (Ct > 35).
- Falls eine oder mehrere RNA-Isolationskontrollen (RIC(s)) mitgeführt wurden, sollten die entsprechenden FAM- und HEX-Kurven keinen Ct-Wert ergeben (CT > 35 für HEX-Kurven).

Testauswertung - Proben

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

- Eine **Probe** ist **negativ für IBDV**, wenn ihre HEX-Kurve positiv (Ct < 40), aber ihre FAM-Kurve negativ ist.
- Eine **Probe** ist **positiv für IBDV**, wenn ihre FAM-Kurve positiv ist (Ct < 42), unabhängig von der HEX-Kurve.
- Eine **Probe** ist **gehemmt**, wenn weder ihre FAM-Kurve noch ihre HEX-Kurve positiv ist.
- Empfehlung:** Im Fall eines invaliden Testergebnisses kann der Test mit z. B. einer 1:4-Verdünnung der entsprechenden RNA wiederholt werden, um eine Hemmung auszuschließen. Die Negativkontrolle dient hierbei als Verdünnungsmedium. Vorzugsweise kann auch die gesamte RNA-Präparation der Probe mit weniger Originalmaterial wiederholt werden.
- Einfache und zuverlässige Dateneingabe zu den Proben, Start des Real-Time RT-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.	Anzahl	Beschreibung
Kylt® IBDV Typing RT-qPCR	31849 / 31850	100 / 25	PCR Kit zur Differenzierung von IBDV Stämmen
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
Kylt® Purifier	31436	1	Gerät zur automatisierten, auf magnetischen Beads basierenden Aufreinigung von RNA und / oder DNA.
Kylt® Purifier 48	31748	1	Gerät zur automatisierten, auf magnetischen Beads basierenden Aufreinigung von RNA und / oder DNA für geringen bis mittleren Durchsatz.
Kylt® Purifier Spin Tips	31434	5	Platte mit 96 separaten Spin Tips zur Mischung des Wellinhalts im Kylt® Purifier. Eine Platte pro Lauf.
Kylt® Purifier Plates	31435	20	Platten für die verschiedenen Reagenzien im Aufreinigungs-kit. 4-5 Platten pro Lauf werden benötigt.

Produktion:

AniCon Labor GmbH | Mühlenstr. 13 | D-49685 Höttinghausen | Germany | www.kylt.eu | info@kylt.eu

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 AniCon Labor GmbH. Alle Rechte vorbehalten. Die in diesem Dokument genannten Marken sind Eigentum der AniCon Labor GmbH bzw. der entsprechenden Markeninhaber.

KURZANLEITUNG

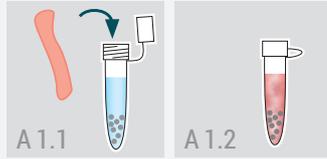
Real-Time RT-PCR Setup

1

A Organ- / Gewebeproben, z. B. Bursa Fabricii, Milz, lymph. Gewebe

1. Probenvorbereitung

1.1 Gewebe in Röhrchen mit Kochsalzlg. (0,9%) oder 0,1 x TE überführen

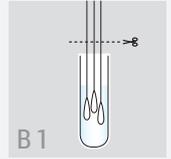


1.2 Homogenisierung

B Sonstige Proben, z.B. Gewebetupfer, Kulturmaterial

1. Probenvorbereitung

max. zulässige Probenanzahl in Röhrchen mit Kochsalzlg. (0,9%) oder 0,1 x TE poolen



2

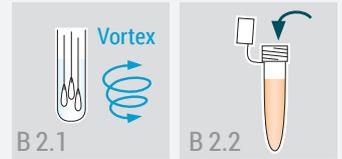
2. Zentrifugation

2.1 kurz abzentrifugieren
2.2 Überstand überführen



2. Auswaschung

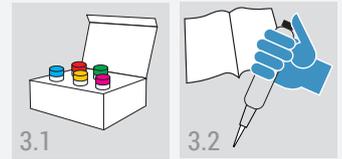
2.1 gründlich vortexen
2.2 Überstand überführen



3

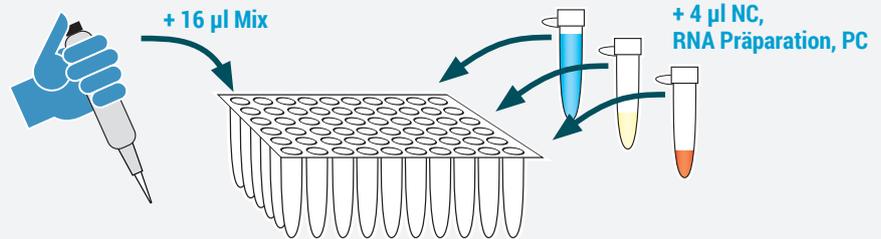
3. RNA Präparation

3.1 Verwendung eines kommerziell erhältlichen RNA-Präparationskits
3.2 weitere Präparation gemäß Anleitung des entsprechenden Kits



4

Master-Mix verteilen und 4 µl NC, RNA Präparation und PC zugeben



5

Kavitäten verschließen, zentrifugieren (empfohlen) und Thermocycler starten



6

Analyse

