



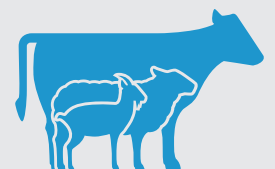
V Nur für *in vitro* Diagnostik.

Kylt[®]

Kylt[®] *Salmonella* spp.

**DNA-Extraktions- und Real-Time PCR Detektionskit
zum Nachweis von *Salmonella* spp.**

www.kylt.eu



Art. Nr. 31019 (100 Reaktionen)

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

Zulassungsnummer: FLI-B 656

Kylt® *Salmonella* spp.

DNA-Extraktions- und Real-Time PCR Detektionskit zum Nachweis von *Salmonella* spp.

Revision	Stand	Beschreibung der Änderungen
Rev003	Aug 2023	Änderung des Firmennamens, des allgemeinen Layouts, sowie minimale Anpassungen von Formulierungen ohne inhaltliche Änderung

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 mit Kylt® *Salmonella* spp. basiert auf einer duplex Real-Time PCR: In einem gemeinsamen Reaktionsansatz werden parallel durch spezifische Primerpaare die beiden Zielgene für *Salmonella* spp. sowie 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 (Real-Time PCR). Die spezifischen Sonden für die Detektion der amplifizierten Zielgen-Fragmente von *Salmonella* spp. bzw. der Interne 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 Positivkontrolle je 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.).
- Das Kit wurde für den Gebrauch durch geschultes Laborpersonal nach standardisierten Verfahren entwickelt. Dieser Gebrauchsinformation ist strikt zu folgen.

B. Reagenzien und Materialien

- Kylt® *Salmonella* spp. Real-Time PCR Detektionskit enthält die folgenden Reagenzien:

Reagenz	Deckel Farbcode	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 (à final 20 µl)	+2 °C bis +8 °C +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

- Umgehend nach Erhalt sind das Kit und seine Komponenten bei +2 °C bis +8 °C zu lagern.
- Der Reaktions-Mix muss dunkel gelagert werden und sollte nicht direktem (Sonnen-)Licht ausgesetzt 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.
- Vor dem ersten Gebrauch, wird die Positivkontrolle rehydriert: je 20 µl der Negativkontrolle werden zu einem Lyophilisat gegeben, für kurze Zeit inkubiert und durch kurzes Puls-Vortexen gemischt. Eine Lagerung in entsprechenden Aliquots mit etwa 5 – 10 µl Volumen (abhängig von der zu erwartenden, durchzuführenden Anzahl an Positiv-Kontrollreaktionen je Kit) 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® *Salmonella* spp. enthalten sind:
 - 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
- 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 Amplifikationskontrolle ist in definierter Kopienzahl im Reaktionsmix enthalten. 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.

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

- Die Methode dieses *Salmonella* spp.-Nachweises umfasst folgende Schritte: kulturelle Voranreicherung, DNA-Präparation, 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-Staub-Sammeltupfer 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 und das ursprüngliche Gefäß (z. B. Stomacher-Beutel) verwerfen.
- **Hinweis:** Die Lagerung im Reagenzröhrchen ist nur eine Empfehlung, es kann für die DNA-Präparation 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 Anreicherungsschritt im Anschluss an die erste Voranreicherung durchgeführt und der gesamte Prozess der DNA-Präparation und Real-Time PCR wiederholt (siehe auch Kapitel E.4. »Auswertung«). Alternativ kann für Proben, deren potentiell hemmender Effekt auf die Real-Time PCR bekannt ist, der zweite Anreicherungsschritt 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 Präparation

- 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. Real-Time PCR Setup und Amplifikation

- Reaktions-Mix und Negativkontrolle vor jedem Gebrauch kurz vortexen und runter zentrifugieren.
- Die Zahl benötigter PCR Reaktionen bestimmen: Anzahl der zu untersuchenden Proben plus Positiv- und Negativkontrolle.
- 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, DNA-Extrakten 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:

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

- Bei einem kombinierten Real-Time PCR Lauf mit anderen Kylt® qPCR Produkten muss 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 Plateauphase (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 - Kontrollreaktionen

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

Kontrollreaktionen	Kanal	
	HEX	FAM
Negativkontrolle	positiv	negativ
Positivkontrolle	positiv	positiv

- Der FAM-Ct-Wert der Positivkontrolle sollte > 15 and ≤ 35 sein.
- Der HEX-Ct-Wert der Positivkontrolle und Negativkontrolle sollte > 10 und ≤ 40 sein.

Testauswertung - Proben

Ziel	Kanal	Signal		
Interne Kontrolle	HEX	positiv	positiv / negativ	negativ
<i>Salmonella</i> spp.	FAM	negativ	positiv	negativ
Die Probe ist <i>Salmonella</i> spp.		negativ	positiv	gehemmt

- Eine **Probe** ist **negativ für *Salmonella* spp.**, wenn ihre HEX-Kurve positiv ($10 < Ct \leq 40$), aber ihre FAM-Kurve negativ ist.
- Eine **Probe** ist **positiv für *Salmonella* spp.**, wenn ihre FAM-Kurve positiv ist ($10 < Ct \leq 42$), unabhängig von der HEX-Kurve.
Positives Ergebnis: Anwesenheit von *Salmonella* spp. (Feldstamm oder Impfstamm), d.h. es sind potentiell vermehrungsfähige meldepflichtige *Salmonellen* enthalten. Ein positives Ergebnis erfordert weitere mikrobiologische Untersuchungen zur Typisierung und Differenzierung von *Salmonella*-Feld und *Salmonella*-Impfstämmen.
- Eine **Probe** ist **gehemmt**, wenn weder ihre FAM-Kurve noch ihre HEX-Kurve positiv ist.
- **Empfehlung:** Im Falle einer gehemmten Probe kann die Voranreicherung zu RVS gegeben und für weitere 5 ± 1 Stunden inkubiert werden (Einzelheiten siehe Kapitel E.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
- 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

Produktname	Artikelnr.	Inhalt	Beschreibung
Kylt® RNA / DNA Purification	31315	50	Kombinierte Aufreinigung von RNA und DNA aus Veterinärproben
Kylt® <i>Salmonella</i> Purification HTP	31433	4 x 96	Magnetic-Beads-basierte DNA-Aufreinigung aus <i>Salmonella</i> -Voranreicherungsproben. Für Automatisierung geeignet.
Kylt® RNA / DNA Purification HTP	31826	4 x 96	Kombinierte, Magnetic-Beads-basierte Aufreinigung von RNA und DNA aus Veterinärproben. Für Automatisierung geeignet.
Kylt® Purifier	31436	1	Gerät zur automatisierten, auf magnetischen Beads basierenden Aufreinigung von RNA und / oder DNA für hohen und mittleren Durchsatz.
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.

G. Bestellinformationen

Für schnellen und effizienten Service senden Sie Ihre Bestellung bitte an orders.kylt-de@san-group.com mit folgenden Informationen:

- Lieferadresse
- Rechnungsadresse
- Telefonkontakt des Bestellers
- Name und Telefonnummer des Endnutzers (wenn abweichend)
- Bestellnummer
- Produktbeschreibung
- Artikelnummer
- Menge und Größe der Produkte

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.

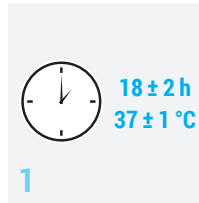


KURZANLEITUNG

Voranreicherung, DNA-Extraktion und Real-Time PCR Setup

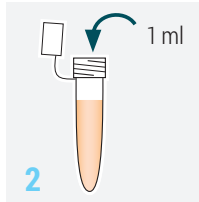
1. Voranreicherung von *Salmonella* spp.

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



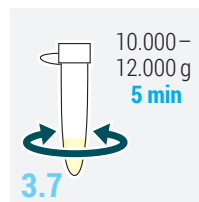
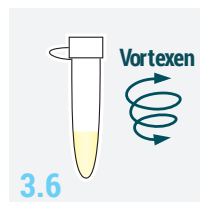
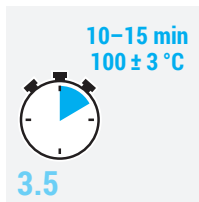
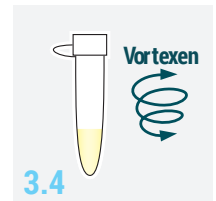
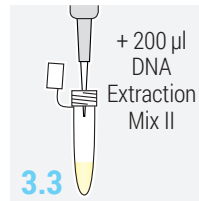
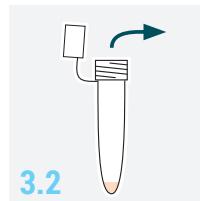
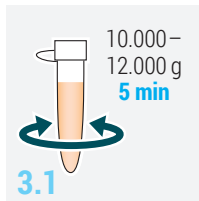
2. Ernte der Bakterien

1 ml Voranreicherung überführen



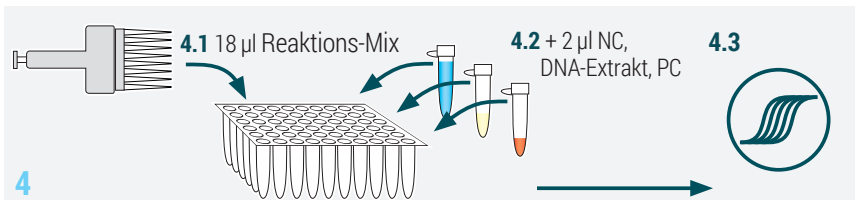
3. DNA-Extraktion

- 3.1 10.000 - 12.000 g 5 min
- 3.2 Überstand verwerfen
- 3.3 Zugabe 200 µl DNA-Extraction 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. Analysis

Threshold setzen und Proben auswerten

