

KYLT[®]

SAN[®]
VET



KYLT[®] CSF RTU

**REAL-TIME RT-PCR DETEKTIONSKIT ZUM
NACHWEIS DES VIRUS DER KLASSISCHEN
SCHWEINEPEST**

i Nur für *in vitro* Veterinärdiagnostik



GEBRAUCHSINFORMATION

RT-qPCR.CSF.RTU, Rev005, Dezember 2023

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

Zulassungsnummer: FLI-C 074

KYLT[®] CSF RTU

Real-Time RT-PCR Detektionskit zum Nachweis des Virus der Klassischen Schweinepest

Revision	Stand	Beschreibung der Änderungen
Rev005	Dez 2023	Neues Handbuchdesign
Rev004	Jun 2023	Änderung des Firmennamens, Geändertes Layout für die Auswertung der Kontrollreaktionen, Ergänzungen in "F. Ähnliche und ergänzende Produkte"

1. ALLGEMEINES

- Kylt[®] CSF RTU RT-qPCR dient dem spezifischen Nachweis von viraler RNA des Virus der Klassischen Schweinepest. Das Produkt ist für die Analyse von Probenmaterial wie Blut, Gewebe und Tupferproben inklusive konservierender Transportmedien von Schweinen und Wildschweinen geeignet.
- Der qualitative Nachweis mit Kylt[®] CSF RTU RT-qPCR basiert auf einer duplex Real-Time RT-PCR: In einem gemeinsamen Reaktionsansatz werden parallel durch spezifische Primerpaare die beiden Zielgene für das Virus der Klassischen Schweinepest 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 des Virus der Klassischen Schweinepest 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 Klassischen Schweinepest Virus-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.

2. REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- Kylt® CSF RTU RT-qPCR enthält die folgenden Reagenzien:

Reagenz	Deckel Farbcode	100 Reaktionen Artikelnr. 31814	25 Reaktionen Artikelnr. 31815	Lagerung
RTU-Mix	● braun	4× 450 µl	1× 450 µl	≤ -18 °C
Positivkontrolle	● rot	4× 50 µl	2× 50 µl	≤ -18 °C
Negativkontrolle	● blau	1× 1 ml	1× 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 RTU-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 **RTU-Mix** (*Ready-To-Use* Reaktionsmix) muss dunkel gelagert werden und sollte nicht länger oder häufiger als nötig direktem (Sonnen-)Licht ausgesetzt werden. Eine Lagerung in entsprechenden Aliquots bei ≤ -18 °C wird empfohlen.

3. 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® CSF RTU 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: Kapitel 6 "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.

4. 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 (Fluoreszenzfarbstoff 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 eingereicht, 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.

5. 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.

5.1. Probenvorbereitung

- Das Mittel ist validiert für das Poolen von bis zu 20 Tupferproben. Für Anwender in Deutschland ist ein Zusammenführen (Poolen) der Proben ausschließlich nach Maßgabe der amtlichen Methodensammlung möglich.
- **Tupfer** sollten in einem ausreichend großen Volumen sterilen Puffers (z.B. 1 ml Kochsalzlösung oder 0,1 x TE) gepoolt werden, indem die Tupfer ausreichend lange eingeweicht und anschließend durch gründliches Vortexen gewaschen werden. Der ausgewaschene Überstand wird für die RNA-Präparation genutzt. Alternativ können Einzeltupfer oder bestimmte Transportmatrices (inkl. z.B. GenoTube® oder FTA®-Karte) auch direkt für die RNA-Präparation verwendet werden.
- **Gewebe- und Organproben** werden gründlich in sterilem Puffer (siehe oben) homogenisiert und ein ausreichendes Volumen wird für die RNA-Präparation genutzt.
- Material aus **kultureller Voranreicherung**, z.B. Zellkultur-Überstand, kann direkt für die RNA-Präparation verwendet werden.

5.2. RNA-Präparation

- 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 6 "Ähnliche und Ergänzende Produkte".
- 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.

5.3. Reaktions-Setup, Reverse Transkription und Amplifikation (Real-Time RT-PCR)

- Aufgetauter RTU-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 RTU-Mix wird durch Puls-Vortexen gemischt, zentrifugiert und 16 µl zu jedem PCR-Reaktionsgefäß oder in jede PCR-Plattenvertiefung ("Kavität") gegeben:

Reagenz	pro Reaktion
RTU-Mix	16 µl
RNA (Negativkontrolle / RNA-Probe / RIC(s) / Positivkontrolle)	4 µl
Gesamtreaktion	20 µl

- Der RTU-Mix sollte (Sonnen-)Licht möglichst nur kurz ausgesetzt werden und sofort wieder bei $\leq -18\text{ °C}$ gelagert werden. Eine Blasenbildung sollte beim Pipettieren von Mix, Proben und Kontrollen vermieden werden.
- 4 µl der **Negativkontrolle** werden in die entsprechende Kavität gegeben und nach Möglichkeit einzeln verschlossen.
- 4 µl **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 **Positivkontrolle** erst nach Zugabe aller Proben und Kontrollen in die entsprechende Kavität gegeben. Vor jedem Gebrauch die aufgetaute Positivkontrolle kurz vortexen und abzentrifugieren (siehe auch Kapitel 2 „Reagenzien und Materialien“).
- 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 Platte wird in den Real-Time PCR Thermocycler gestellt und die Amplifikation mit dem Kylt® Profil I wie unten angegeben gestartet.

Kylt® Profil I

Schritt	Beschreibung	Temperatur	Dauer	
1	Reverse Transkription	50 °C	10 min	
2	Aktivierung Polymerase	95 °C	1 min	
3	Denaturierung	95 °C	10 sek	} 42 Zyklen
4	Annealing & Extension	60 °C	1 min	
5	Fluoreszenzmessung	Kanäle FAM & 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.

5.4. 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 Klassische Schweinepest Virus-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

- Die HEX-Kurve der Negativkontrolle ist negativ (Ct > 35).
- Der FAM-Ct-Wert der Positivkontrolle sollte > 15 und ≤ 35 sein und der HEX-Ct-Wert ≤ 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 (β-Aktin)	HEX	positiv	positiv / negativ	negativ
Virus der Klassischen Schweinepest	FAM	negativ	positiv	negativ
Die Probe ist für das Virus der Klassischen Schweinepest		negativ	positiv	gehemmt

- Eine **Probe** ist **negativ für das Virus der Klassischen Schweinepest**, wenn ihre HEX-Kurve positiv (Ct ≤ 35), aber ihre FAM-Kurve negativ ist.
- Eine **Probe** ist **positiv für das Virus der Klassischen Schweinepest**, wenn ihre FAM-Kurve positiv ist (Ct ≤ 42), unabhängig von der HEX-Kurve.
- Eine **Probe** ist **gehemmt**, wenn weder ihre FAM- 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. Die Negativkontrolle dient hierbei als Verdünnungsmedium. Vorzugsweise wird die gesamte RNA-Präparation der Probe mit weniger Originalmaterial wiederholt. Anschließend kann zusätzlich eine Ethanol-fällung zur Konzentrierung der RNA vorgenommen 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.

6. ÄHNLICHE UND ERGÄNZENDE PRODUKTE

Produktname	Artikelnr.	Inhalt	Beschreibung
Kylt® ASF qPCR	31329 / 31806 / 31807	400 / 100 / 25	Real-Time PCR Detektionskit zum Nachweis des Virus der Afrikanischen Schweinepest.
Kylt® ASF/CSF RTU	31822 / 31823	100 / 25	Real-Time PCR Detektionskit zum separaten Nachweis des Virus der afrikanischen und der klassischen Schweinepest.
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. 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 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 Aufreinigungs-kit. 4-5 Platten pro Lauf werden benötigt. Ausreichend für 320 bis 480 Proben (je nach Gerät und Protokoll).

7. 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 · Muehlenstrasse 13 · 49685 Hoeltinghausen · Deutschland
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.

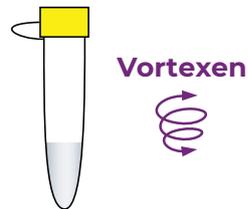




KURZANLEITUNG Real-Time RT-PCR Setup

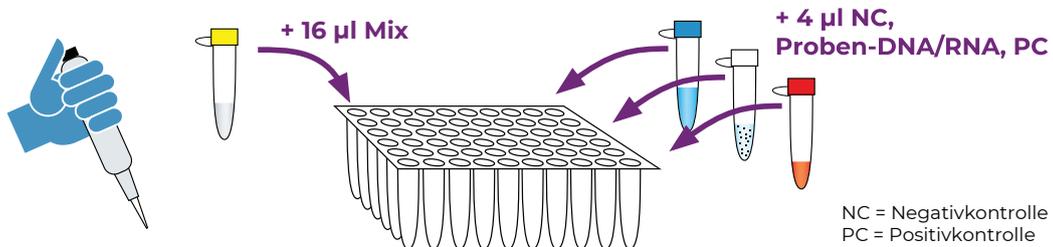
1

Vortexen und zentrifugieren



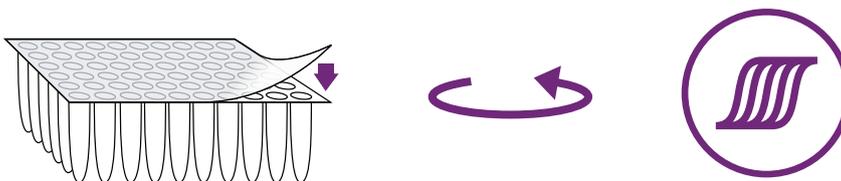
2

Reaktions-Mix (oder RTU-Mix) dispensieren und 4 µl NC, Proben-DNA/RNA, PC zugeben



3

Versiegeln, zentrifugieren (empfohlen), Thermocycler starten



4

Analyse

