

KYLT[®]

SAN[®]
VET



KYLT[®] SE DIVA 2

REAL-TIME PCR NACHWEIS

i Nur für die In-vitro-Veterinärdiagnostik.

WWW.KYLT.EU | WWW.SAN-VET.COM

Passion for Innovation



GEBRAUCHSANWEISUNG

qPCR.SE DIVA 2.02, Rev012, June 2025

KYLT® SE DIVA 2

Real-Time PCR Nachweis

1. ALLGEMEIN

Das Kit ist für die Differenzierung der folgenden *Salmonella Enteritidis* (SE) Lebendimpfstoffstämme (SEV bzw. SEV2) von Feldstämmen (SEf) bestimmt:

- Name des Lebendimpfstoffstamms: Sm24/Rif12/Ssq
- Name des kommerziell erhältlichen Impfstoffs: AviPro SALMONELLA VAC E (und AviPro SALMONELLA DUO - bitte beachten Sie unten angegebenen Hinweis, Hersteller: Elanco (Lohmann Animal Health GmbH))
- Name des Lebendimpfstoffstamms: CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-
- Name des kommerziell erhältlichen Impfstoffs: Primun Salmonella E (Hersteller: CALIER)





| Eigenschaft | Beschreibung |
|-------------------------|---|
| Artikelname | Kylt® SE DIVA 2 LD 100, Kylt® SE DIVA 2 LD 25 |
| Organismus | Bakterium |
| Zielmolekül | DNA |
| Technologie | Real-Time PCR |
| Tierart | Geflügel (Huhn, Pute) |
| Vortestung mit | <i>Salmonella</i> spp. 2.0 |
| Probenart | <ul style="list-style-type: none">■ Voranreicherungsproben, die positiv auf <i>Salmonella</i> spp. getestet wurden (Ct < 25), <i>Salmonella</i> spp. positives Koloniematerial aus kulturellen Prozessen (z. B. DIN EN ISO 6579), Bei Proben mit einem positiven Ergebnis Ct > 25 im <i>Salmonella</i> spp.-Screening sollte entweder ein zweiter Anreicherungs-schritt durchgeführt oder die Analyse mit Koloniematerial aus mikrobiologischer Kultur wiederholt werden. |
| Ziel FAM-Kanal (520 nm) | <i>Salmonella Enteritidis</i> |
| Ziel Cy5-Kanal (670 nm) | SE Sm24/Rif12/Ssq und CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq- |
| Ziel TXR-Kanal (620 nm) | SE Feldstamm |
| Temperaturprofil | Kylt® Profil I oder Kylt® Profil II |

- Das Kit wurde für den Gebrauch durch geschultes Laborpersonal nach standardisierten Verfahren entwickelt. Dieser Gebrauchsinformation ist strikt zu folgen.
- Mit Einschränkungen kann das Kit auch für *Salmonella* spp. positive Voranreicherungen in gepuffertem Peptonwasser verwendet werden. In diesem Fall ist nur der Nachweis des Impfstammes von Bedeutung, jeder Hinweis auf einen SE-Feldstamm muss durch kulturelle Isolierungsmethoden, z. B. ISO 6579 und Kauffmann-White-Agglutination, bestätigt werden.
Achtung: Wenn das Kit zur Untersuchung von Beständen verwendet werden soll, die mit dem Impfstoff AviPro SALMONELLA DUO geimpft wurden, kann das Kit nur für *Salmonella* spp. positives Koloniematerial (Isolate) aus kulturellen Verfahren verwendet werden.

2. REAL-TIME PCR

Die amplifizierten Ziel-Sequenzen werden im Verlauf der PCR anhand fluoreszierender Sonden in Echtzeit detektiert (Real-Time PCR). Die emittierten Fluoreszenzen werden durch den Real-Time PCR Thermocycler erfasst. Der erregerspezifische Status einer Probe kann durch die Berücksichtigung aller amplifizierten Zielsequenzen pro Probe sowie der Negativ- und Positivkontrollen pro Lauf bewertet werden. In der Real-Time PCR werden die Zielgene durch spezifische Primerpaare in der Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) amplifiziert.

3. KIT-INHALT

| Reagenz | Deckelfarbe | 100 Reaktionen Artikelnr. 31161 | 25 Reaktionen Artikelnr. 31162 | Lager- temperatur |
|-----------------------|--|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Reaktions-Mix |  Violett | 4× 450 µl | 1× 450 µl | <= -18°C |
| Positivkontrolle SEF |  Rot-weiß | 2× Lyoph. a final 50 µl | 1× Lyoph. a final 50 µl | <= -18°C |
| Positivkontrolle SEV2 |  Rot | 2× Lyoph. a final 50 µl | 1× Lyoph. a final 50 µl | <= -18°C |
| Negativkontrolle |  Blau | 1× 1 ml | 1× 1 ml | <= -18°C |

4. LAGERBEDINGUNGEN

- Falls erforderlich, bereiten Sie Aliquots der Reagenzien vor, um die Einfrier-Auftau-Zyklen auf 3 zu begrenzen.
- Die Komponenten sind innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsdauer zu verwenden (siehe Verpackungsetikett).
- Komponenten aus verschiedenen Chargen dürfen nicht miteinander vermischt oder ausgetauscht werden.
- Der **Reaktions-Mix** muss lichtgeschützt gelagert und verwendet werden.

5. REAGENZVORBEREITUNG

- 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.

6. ERFORDERLICHE AUSSTATTUNG, GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

- Real-Time PCR Cycler, der die entsprechende Fluoreszenzwellenlänge detektiert (Bitte beachten Sie, dass die standardmäßige Normalisierungsoption gegen ROX (z. B. bei ABI Cyclern) deaktiviert sein muss).
- Kompatible PCR-Platten, Streifen oder einzelne Gefäße.
- Aufreinigungs kit, das eine ausreichend hohe Konzentration an inhibitorfreier DNA/RNA liefert (z. B. Kylt RNA/DNA-Aufreinigungsprodukte).
- Tisch-Mikrozentrifuge.
- Vortexer.
- Einstellbare Mikropipetten, die den entsprechenden Volumenbereich abdecken.
- Passende PCR-reine Pipettenspitzen mit Filtern.
- Zertifizierte Nuklease-freie (PCR-rein) Verbrauchsmaterialien.
- Puderfreie Handschuhe, die während des gesamten Setups zu tragen sind und im Falle einer Kontamination gewechselt werden müssen.

7. KONTROLLREAKTIONEN

- Jeder PCR-Lauf muss eine **Positivkontrolle** enthalten, um die Spezifität und Effizienz der Reagenzien und der Reaktion selbst sowie die Leistung der Real-Time-PCR und des Real-Time-PCR-Thermocyclers zu überwachen.

- Jeder PCR-Lauf muss eine **Negativkontrolle** enthalten, um sicherzustellen, dass keine Kontaminationen vorhanden sind.

8. REAKTIONSETUP

- **Hinweis:** Bevor Sie diese Methode anwenden, untersuchen Sie die Proben auf den *Salmonella* spp.-Status, bitte beachten Sie die entsprechende Gebrauchsanweisung. Nur bestätigte *Salmonella* spp.-positive Proben können mit dieser Methode analysiert werden. Daher ist die kulturelle Voranreicherung und DNA-Extraktion entsprechend der Gebrauchsanweisung für die *Salmonella* spp.-bestätigende PCR-Methode durchzuführen. Dadurch wird auch die Qualität des DNA-Extrakts, der für diese Methode verwendet wird, überprüft und bestätigt.
- Die verwendeten Reagenzien werden vor jedem Gebrauch kurz durch Vortexen gemischt und zentrifugiert.
- Die Gesamtzahl der Reaktionen entspricht der Anzahl der Proben plus einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle pro Lauf. Wenn Sie dieses Setup mit einem Kylt Standard kombinieren, fügen Sie bitte die entsprechende Anzahl von Reaktionen hinzu.
- Pipettieren Sie 16 µl des gebrauchsfertigen **Reaktionsmixes** in jede verwendete Kavität oder in jedes PCR-Reaktionsgefäß.
- Der Reaktionsmix sollte (Sonnen-)Licht möglichst nur kurz ausgesetzt und sofort wieder bei der richtigen Temperatur gelagert werden.
- Eine Blasenbildung sollte beim Pipettieren der Mixe, Proben und Kontrollen vermieden werden.
- 4 µl der **Negativkontrolle** in die entsprechende Kavität geben und nach Möglichkeit einzeln verschließen.
- 4 µl **Probe** in die entsprechende Kavität geben und nach Möglichkeit einzeln verschließen.
- 4 µl der **SEF-Positivkontrolle** in die entsprechende Kavität geben und nach Möglichkeit einzeln verschließen. Anschließend 4 µl der **SEV-Positivkontrolle** in die entsprechende Kavität geben und nach Möglichkeit einzeln verschließen.
- Sobald alle Reaktionen angesetzt sind, werden alle Kavitäten verschlossen und zentrifugiert.
- Die Platte wird in den Real-Time PCR Thermocycler gestellt und die Amplifikation mit dem Kylt Profil II oder Kylt Profil I wie unten angegeben gestartet.
- Mit Kylt Profil II können diese und die meisten anderen Kylt qPCR-Nachweisverfahren gleichzeitig in einem einzigen PCR-Lauf durchgeführt werden.
- 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 befolgen Sie die Anweisungen Ihres Real-Time PCR-Thermocyclers, wie vom Hersteller empfohlen.

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 / Wellenlängen (siehe S. 2) | | |

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 / Wellenlängen (siehe S. 2) | | |

9. ALLGEMEINE AUSWERTUNG DES PCR-LAUFS UND QUALITÄTSKONTROLLE

- Eine ideale positive PCR-Kurve beginnt mit einer linearen Phase, die dann exponentiell ansteigt und in eine Plateauphase übergeht.
- Die Basislinie in einer Real-Time PCR beschreibt den Abschnitt der Amplifikationskurve, in dem noch keine spezifische Produktamplifikation sichtbar ist, also vor Beginn der exponentiellen Phase der PCR.
- Die automatisierte Auswertung der jeweiligen Cycler Software kann verwendet werden. Bitte achten Sie darauf, mögliche Artefakte zu identifizieren.
- Der Threshold (Schwellenwert) sollte bei manueller Einstellung nahe genug an der Basislinie liegen, um alle Kurven, die eine klare exponentielle Phase zeigen, einzuschließen, aber alle unspezifischen Fluoreszenzanstiege auszuschließen.
- Der Schnittpunkt zwischen der Kurve und dem Schwellenwert ist der Ct-Wert. Je niedriger der Ct-Wert ist, desto höher ist die Konzentration des Zielmoleküls in der Probe zu Beginn des Tests.

10. TESTAUSWERTUNG - KONTROLLREAKTIONEN

- Der Real-Time PCR-Lauf ist nur dann valide, wenn die Kurven der Kontrollreaktionen wie folgt ausgewertet werden können:
- Um die erhaltenen Ergebnisse richtig interpretieren zu können, muss bekannt sein, welcher Impfstoff im Bestand verwendet wurde.
- Achtung! In Proben mit positivem TXR- und/oder Cy5-Kanal bzw. negativem FAM-Kanal konnten weder das Serovar *Salmonella Enteritidis* noch der SE-Impfstamm nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass ein anderes *Salmonellen*-Serovar in der Probe vorhanden ist.

| Kontrollreaktionen | Pathogen-spezifische Kanäle | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | FAM | | TXR | | Cy5 | |
| Negative Control | negativ | Ct > 35 | negativ | Ct > 35 | negativ | Ct > 35 |
| SEf-Positive Control | positiv | Ct ≤ 35 | positiv | Ct ≤ 35 | negativ | Ct > 35 |
| SEV2-Positive Control | positiv | Ct ≤ 35 | negativ | Ct > 35 | positiv | Ct ≤ 35 |

11. TESTAUSWERTUNG - PROBEN

| Ziel | Kanal | Signal | | | |
|---|-------|---------|---------|--------------------------------------|-------------------|
| <i>Salmonella Enteritidis</i> (SE) | FAM | positiv | positiv | positiv | negativ |
| SE Feldstamm (SEf)* | TXR | negativ | positiv | negativ | positiv / negativ |
| SEV2 (SE Impfstamm Sm24/Rif12/Ssq oder CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-) | Cy5 | positiv | negativ | negativ | positiv / negativ |
| Die Probe ist Salmonella Enteritidis | | positiv | positiv | positiv Keine Typisierung möglich | negativ |
| Die Probe ist SEf* | | negativ | positiv | negativ | negativ |
| Die Probe ist SE Impfstamm Sm24/Rif12/Ssq oder CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq- | | positiv | negativ | negativ | negativ |

* Dies gilt auch für den Nachweis von SE-Feldstämmen sowie von Lebendimpfstämmen, die nicht Sm24/Rif12/Ssq oder CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq- sind. Bei direkter Verwendung von gepufferten Peptonwasseranreicherungen ist nur der Nachweis der Impfstämme Sm24/Rif12/Ssq und CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq- ein gültiges Ergebnis. Jeder Hinweis auf einen Feldstamm muss durch kulturelle und biochemische Methoden bestätigt werden.

- Eine **Probe** ist **negativ für SE, SEf und SEV**, wenn ihre FAM-, Cy5- und TXR-Kurve negativ sind.
- Eine **Probe** ist **positiv für Serovar Salmonella Enteritidis (SE)**, wenn ihre FAM-Kurve positiv ist, unabhängig von den Cy5- und TXR-Kurven. Ist die Probe im FAM-Kanal positiv und im Cy5- und TXR-Kanal negativ, kann der in der Probe vorhandene SE-Stamm nicht weiter differenziert werden. In diesem Fall sollte die Analyse unter Verwendung von Koloniematerial aus ISO 6579-abgeleiteten Verfahren wiederholt werden.
- Eine **Probe** ist **positiv für SEV (Impfstamm Sm24/Rif12/Ssq oder CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-)**, wenn die FAM- und Cy5-Kurven positiv sind (Ct < 30).
- Eine **Probe** ist **positiv für SEf**, wenn die FAM- and TXR-Kurven positiv sind (Ct < 30).
- **Achtung:** Dieses Ergebnis umfasst auch den Nachweis von SE-Feldstämmen sowie von anderen Lebendimpfstoffstämmen als SE Sm24/Rif12/Ssq or CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-.
- Wurde diese Methode direkt auf gepufferte Peptonwasseranreicherungen angewandt, stellt nur der Nachweis eines Impfstammes ein gültiges Ergebnis dar. Jeder Hinweis auf eine SEf-Infektion muss durch kulturelle und biochemische Methoden (z. B. ISO 6579 und Kaufmann-White-Schema) bestätigt werden.
- Eine mögliche **Doppelinfektion mit SEV und SEf oder mit SEV und einem anderen Salmonella-Serovar** ist möglich, wenn die FAM-, TXR- und Cy5-Kurven positiv sind (CT < 30). Doppelinfektionen sind durch kulturelle und biochemische Methoden zu bestätigen (z. B. ISO 6579 und Kaufmann-White-Schema).
- Mittels der Kylt Software kann eine einfache und zuverlässige Dateneingabe zu den Proben, der Start des Real-Time PCR-Laufes sowie eine anschließende qualitative Proben-Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse vorgenommen werden.

12. BESTELLINFORMATIONEN

Es gelten die allgemeinen Geschäftsbedingungen der SAN Group Biotech Germany GmbH (www.anicon.eu). Um einen schnellen und effizienten Service zu gewährleisten, senden Sie Ihre Bestellung bitte an orders.kylt-de@san-group.com und geben Sie bitte die folgenden Informationen an:

- Lieferadresse
- Rechnungsadresse
- Telefonnummer des Käufers
- Falls abweichend vom Käufer, Telefonnummer des Endnutzers
- Bestellnummer
- Artikelname- und nummer
- Anzahl und Größe der Artikel
- Geben Sie an, ob Ihr Konto von der Mehrwertsteuer befreit ist

13. REVISIONSVERLAUF

| Revision | Stand | Anpassungen |
|----------|-----------|--|
| Rev010 | Jul 2023 | gültig ab 01. August 2023: Nicht mehr enthalten ist der Kylt® DNA Extraction-Mix II, neues Layout für die Testauswertung. |
| Rev011 | Jan 2024 | Ergänzung des Impfstammes CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq- (der im kommerziell erhältlichen Impfstoff Primun Salmonella E enthalten ist), der auch im SEV2-Kanal (Cy5-Kanal) zusammen mit dem AviPro-Salmonellen-Impfstoff nachgewiesen wird, Deckelfarbe des SEf PC ist rot-weiß. |
| Rev012 | June 2025 | Neues Layout/Design; Revisionsstand und Inhalt aller verfügbaren Sprachen an die englische Version angepasst; falsche Artikelnummer im Kapitel „2. Kit-Inhalt“ korrigiert, geändertes TÜV-Logo |

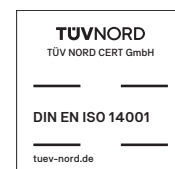
Produktion: SAN Group Biotech Germany GmbH · Mühlenstrasse 13 · 49685 Höltinghausen · Deutschland
www.kylt.eu · kylt-de@san-group.com

Entwicklung, Herstellung und Vertrieb von In-vitro-Diagnostika ist ISO 14001:2015 und ISO 9001:2015 zertifiziert.

KYLT® ist eine eingetragene Marke.

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.

© 2025 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.

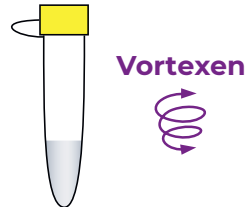




KURZANLEITUNG REAL-TIME PCR SETUP

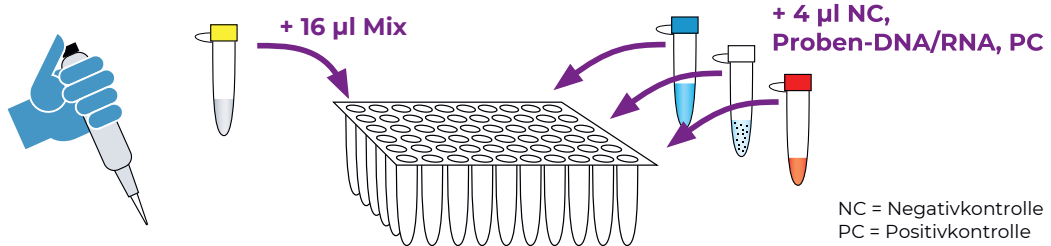
1

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

