

# KYLT<sup>®</sup>

**SAN**<sup>®</sup>  
VET



## **KYLT<sup>®</sup> SE DIVA 2**

**PCR EN TIEMPO REAL**

**i** Solo para diagnósticos veterinarios in vitro.

[WWW.KYLT.EU](http://WWW.KYLT.EU) | [WWW.SAN-VET.COM](http://WWW.SAN-VET.COM)

**Passion for Innovation**



# INSTRUCCIONES DE USO

qPCR.SE DIVA 2.02, Rev012, June 2025

## KYLT® SE DIVA 2

### PCR en tiempo real

#### 1. GENERAL

El kit está destinado a la diferenciación de las siguientes cepas vacunales vivas (SEV, SEV2 respectivamente) de *Salmonella enteritidis* (SE) de las cepas de campo (SEf):

- Nombre de la cepa: Sm24/Rif12/Ssq
- Nombre de la vacuna comercializada: AviPro SALMONELLA VAC E (y AviPro SALMONELLA DUO: tenga en cuenta la nota siguiente, Fabricante: Elanco (Lohmann Animal Health GmbH))
- Nombre de la cepa: CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-
- Nombre de la vacuna comercializada: Primun Salmonella E (Fabricante: CALIER)





Característica	Descripción
Nombre del artículo	Kylt® SE DIVA 2 LD 100, Kylt® SE DIVA 2 LD 25
Organismo	Bacterias
Molécula objetivo	ADN
Tecnología	PCR en tiempo real
Grupo hospedador	Aves de corral (pollo, pavo)
Ejemplo de requisito previo	<i>Salmonella</i> spp. 2.0
Tipos de muestras	<ul style="list-style-type: none"><li>■ Muestras de preenriquecimiento que dieron positivo por <i>Salmonella</i> spp. (Ct &lt; 25), Material de colonias de <i>Salmonella</i> spp. positivo procedente de procesos de cultivo (p. ej. DIN EN ISO 6579), En caso de muestras con un resultado positivo Ct &gt; 25 en el cribado de <i>Salmonella</i> spp. deberá realizarse un segundo paso de enriquecimiento o repetirse el análisis utilizando material de colonias procedente de cultivo microbiológico</li><li>■ En el caso de muestras procedentes de los Programas Nacionales de Control de <i>Salmonella</i> en avicultura en España, utilizar el método a partir de material de colonias de <i>Salmonella</i> spp. procedentes de procesos de cultivo microbiológico</li></ul>
Canal FAM objetivo (520 nm)	<i>Salmonella enteritidis</i>
Canal Cy5 objetivo (670 nm)	SE Sm24/Rif12/Ssq y CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-
Canal TXR objetivo (620 nm)	Cepas de campo SE
Perfil de temperatura	Kylt® Perfil I o Kylt® Perfil II

- Estos kits han sido desarrollados para usarse por personal de laboratorio formado siguiendo procedimientos estandarizados. Este modo de empleo debe seguirse estrictamente.
- Con limitaciones, el kit también puede utilizarse para preenriquecimientos positivos de *Salmonella* spp. en agua de peptona tamponada. En este caso, solo la detección de la cepa vacunal es significativa, cualquier indicación de una cepa de campo SE tiene que confirmarse por métodos de aislamiento de cultivo, por ejemplo ISO 6579 y Aglutinación Kauffmann-White. **Atención:** Si el kit se va a utilizar para examinar bandadas que se han vacunado con AviPro SALMONELLA DUO; el kit solo se puede utilizar en material de colonias positivas (aisladas) de *Salmonella* spp. procedentes de procesos de cultivo.

## 2. PCR EN TIEMPO REAL (REAL-TIME PCR)

Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas marcadas con fluorescencia durante la reacción de PCR en tiempo real. La fluorescencia emitida se mide ópticamente por separado en el termociclador de PCR en tiempo real. El estado patógeno-específico de una muestra puede evaluarse considerando todas las dianas amplificadas por muestra y los controles negativo y positivo por ejecución. Durante la PCR en tiempo real, los genes diana se amplifican mediante los respectivos pares de cebadores en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## 3. CONTENIDO DEL KIT

Reactivo	Código de color tapa	100 Reacciones N.º art. 31161	25 Reacciones N.º art. 31162	Almacenamiento
Mezcla reactiva	 Violeta	4× 450 µl	1× 450 µl	<= -18°C
Control positivo SEF	 Rojo-blanco	2× Lyoph. a final 50 µl	1× Lyoph. a final 50 µl	<= -18°C
Control positivo SEV2	 Rojo	2× Lyoph. a final 50 µl	1× Lyoph. a final 50 µl	<= -18°C
Control negativo	 Azul	1× 1 ml	1× 1 ml	<= -18°C

## 4. TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO

- Si es necesario, preparar alícuotas de los reactivos para limitar a 3 los ciclos de congelación-descongelación.
- Los componentes deben utilizarse dentro del plazo de caducidad indicado (véase la etiqueta de la caja).
- Los componentes de diferentes lotes no pueden mezclarse ni intercambiarse.
- La **mezcla reactiva** debe almacenarse y manipularse protegida de la luz.

## 5. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Antes del primer uso, rehidratar cada vial de **control positivo**: añadir 50 µl de control negativo por vial, incubar brevemente a temperatura ambiente y mezclar bien mediante mezcla vorticial repetida.

## 6. EQUIPOS, DISPOSITIVOS Y CONSUMIBLES NECESARIOS

- Termociclador de PCR en tiempo real capaz de detectar la longitud de onda de fluorescencia adecuada. (Tenga en cuenta que la opción de normalización por defecto contra ROX (por ejemplo, utilizando termocicladores ABI) debe estar desactivada).
- Tiras de pocillos PCR compatibles o tubos individuales.
- Kit de purificación que produce una concentración suficientemente alta de ADN/ARN sin inhibidores (por ejemplo, productos de purificación de ADN/ARN Kyt).
- Microcentrífuga de sobremesa.
- Mezclador vorticial.
- Micropipetas ajustables que cubren el intervalo de volumen adecuado.
- Puntas adecuadas de pipeta PCR-clean con filtros.
- Consumibles certificados sin nucleasas (PCR-clean).
- Guantes libres de talco que deben llevarse durante todo el montaje y cambiarse en caso de contaminación.

## 7. REACCIONES DE CONTROL

- Cada ciclo de PCR debe incluir un **control positivo** para controlar la especificidad y eficacia de los reactivos y de la propia reacción, incluido el rendimiento de la PCR en tiempo real y del termociclador de PCR en tiempo real.

- Cada ciclo de PCR debe incluir un **control negativo** para asegurar la ausencia de contaminaciones.

## 8. CONFIGURACIÓN DE LA REACCIÓN

- **Nota:** Antes de utilizar este método, examine las muestras con respecto al estado de *Salmonella* spp., consulte las instrucciones de uso correspondientes. Solo las muestras confirmadas positivas por *Salmonella* spp. pueden analizarse con este método. Por lo tanto, el preenriquecimiento de cultivo y la extracción de ADN deben realizarse de acuerdo con las instrucciones de uso del método PCR de confirmación de *Salmonella* spp. De este modo, también se demuestra que el extracto de ADN que se utilizará en este método tiene la calidad adecuada.
- Antes de cada uso, ejecutar una breve mezcla vorticial y centrifugar los reactivos utilizados.
- El número total de reacciones es el número de muestras, además de un control positivo y un control negativo por serie. En caso de combinar esta configuración con un Kylt Standard, añadir el número apropiado de reacciones.
- Pipetee 16 µl de la **mezcla reactiva** lista para usar en cada uno de los pocillos o tubos de PCR utilizados.
- Mantener la mezcla reactiva expuesta a la luz (solar) el menor tiempo posible y devolverla a la temperatura de almacenamiento adecuada inmediatamente después de su aplicación.
- Evite la formación de burbujas al pipetear la mezcla, las muestras y los controles.
- Añadir 4 µl del **control negativo** a la cavidad correspondiente y sellarla individualmente, si es posible.
- Añadir 4 µl de cada **muestra** a las cavidades correspondientes y sellarlas individualmente, si es posible.
- Añadir 4 µl de cada **control positivo SEf** a la cavidad correspondiente. Después, añadir 4 µl del **control positivo SEV** a la cavidad correspondiente.
- Una vez preparadas todas las reacciones, sellar las cavidades y centrifugar brevemente.
- Coloque las cavidades en el termociclador de PCR en tiempo real y realice la prueba con Kylt Perfil II o Kylt Perfil I.
- Con Kylt Profile II, este y la mayoría de los demás métodos de detección qPCR de Kylt pueden llevarse a cabo simultáneamente en una sola ejecución de PCR.
- Kylt Profile I permite la ejecución combinada de este y la mayoría de los otros métodos de detección RT-qPCR de Kylt, así como de los productos de detección qPCR de Kylt.
- En el caso de una ejecución combinada de (RT-)PCR en tiempo real, asegúrese de que se detectan todos los canales necesarios.
- Siga las instrucciones especificadas de su termociclador de PCR en tiempo real según las recomendaciones del fabricante.

### Kylt® Perfil II

Paso n.º	Descripción	Temperatura	Duración
1	Activación de la polimerasa	95 °C	10 minutos
2	Desnaturalización	95 °C	15 segundos
3	Hibridación y extensión	60 °C	1 minuto
4	Detección por fluorescencia	canales/longitudes de onda: ver página 2	

} 42 ciclos

### Kylt® Perfil I

Paso n.º	Descripción	Temperatura	Duración
1	Transcripción inversa	50 °C	10 minutos
2	Activación de la polimerasa	95 °C	1 minuto
3	Desnaturalización	95 °C	10 segundos
4	Hibridación y extensión	60 °C	1 minuto
5	Detección por fluorescencia	canales/longitudes de onda: ver página 2	

} 42 ciclos

## 9. EVALUACIÓN GENERAL DEL CICLO PCR Y CONTROL DE CALIDAD

- Una curva de PCR positiva ideal comienza con una fase lineal que luego aumenta exponencialmente y disminuye hasta una fase plana.
- La línea de base es el valor medio de una gran sección del principio del experimento que se resta de todos los valores de fluorescencia para mostrar solo el aumento neto de fluorescencia por pocillo y canal.
- Puede utilizarse la evaluación automatizada del software del termociclador correspondiente. Tenga cuidado de identificar posibles artefactos.
- El umbral, si se ajusta manualmente, debe fijarse lo suficientemente cerca de la línea de base para incluir todas las curvas que muestren una fase exponencial clara, pero para excluir todos los aumentos de fluorescencia inespecíficos.
- La intersección entre la curva y el umbral es el valor Ct. Cuanto menor sea el valor Ct, mayor será la concentración de la molécula diana en la muestra al comienzo de la prueba.

## 10. EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS: REACCIONES DE CONTROL

- La ejecución de la PCR en tiempo real solo es válida si las curvas de las reacciones de control pueden evaluarse del siguiente modo:
- Para interpretar correctamente los resultados obtenidos es obligatorio saber qué vacuna se ha aplicado a la bandada.
- Atención: En las muestras con un canal TXR o Cy5 positivo y un canal FAM negativo, respectivamente, no se pudieron detectar ni la *Salmonella enteritidis* del serovar ni las cepas vacunales SE. Sin embargo, otro serovar de *Salmonella* podría estar presente en la muestra.

Reacciones de control	Canal específico de patógenos					
	FAM		TXR		Cy5	
Control negativo	negativo	Ct > 35	negativo	Ct > 35	negativo	Ct > 35
SEf-Control positivo	<b>positivo</b>	<b>Ct ≤ 35</b>	<b>positivo</b>	<b>Ct ≤ 35</b>	negativo	Ct > 35
SEV2-Control positivo	<b>positivo</b>	<b>Ct ≤ 35</b>	negativo	Ct > 35	<b>positivo</b>	<b>Ct ≤ 35</b>

## 11. EVALUACIÓN DE PRUEBAS: MUESTRAS

Objetivo	Canal	Señal			
<i>Salmonella enteritidis</i> (SE)	FAM	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	negativo
Cepa de campo SE (SEf)*	TXR	negativo	<b>positivo</b>	negativo	positivo / negativo
SEV2 (cepa vacunal SE Sm24/Rif12/Ssq o CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-)	Cy5	<b>positivo</b>	negativo	negativo	positivo / negativo
La muestra es <i>Salmonella enteritidis</i>		<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	positivo no es posible seguir escribiendo	negativo
La muestra es SEf*		negativo	<b>positivo</b>	negativo	negativo
La muestra es cepa vacunal SE Sm24/Rif12/Ssq o CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-		<b>positivo</b>	negativo	negativo	negativo

\* Esto incluye también la detección de cepas de campo SE, así como de cepas vacunales vivas que no sean Sm24/Rif12/Ssq o CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-. En caso de utilización directa de los enriquecimientos en agua de peptona tamponada, solo la detección de las cepas vacunales Sm24/Rif12/Ssq y CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq- son resultados válidos. Cualquier indicio de una cepa de campo debe confirmarse mediante pruebas de cultivo y bioquímicas.

- Una **muestra** es **negativa para SE, SEf y SEV** si las curvas FAM-, Cy5- y TXR son negativas.
- Una **muestra** es **positiva por el serovar *Salmonella enteritidis* (SE)** si la curva FAM es positiva, independientemente de las curvas Cy5- y TXR. En caso de que la muestra sea positiva en el canal FAM y negativa en los canales Cy5 y TXR, la cepa SE presente en la muestra no podrá diferenciarse. En este caso, el análisis debe repetirse utilizando material de colonias procedente de procesos derivados de la norma ISO 6579.
- Una **muestra** es **positiva para SEV (cepa vacunal Sm24/Rif12/Ssq o CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-** si las curvas FAM- y Cy5 son positivas (Ct < 30).
- Una **muestra** es positiva para SEf si las curvas FAM y TXR son positivas (Ct < 30).
- **Atención:** Este resultado también incluye la detección de cepas SE de campo, así como de cepas vacunales vivas distintas de SE Sm24/Rif12/Ssq o CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-.
- En caso de que este método se haya utilizado directamente en enriquecimientos de Agua Peptónica Tamponada, solo la detección de una cepa vacunal representa un resultado válido. Todo indicio de infección por SEf debe confirmarse mediante métodos de cultivo y bioquímicos (por ejemplo, ISO 6579 y esquema Kauffmann White).
- Una posible **infección doble con SEV y SEf o con SEV y otro serovar de *Salmonella*** es posible si las curvas FAM-, TXR- y Cy5 son positivas (CT<30). Las infecciones dobles deben confirmarse mediante métodos de cultivo y bioquímicos (por ejemplo, ISO 6579 y esquema Kaufmann-White).
- La entrada de datos de muestras, el inicio de la PCR en tiempo real, el análisis cualitativo final y la documentación pueden realizarse de forma cómoda y fiable con el software Kylt, consúltenos.

## 12. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Se aplican los términos y condiciones generales de SAN Group Biotech Germany GmbH ([www.anicon.eu](http://www.anicon.eu)). Para un servicio rápido y eficaz, envíe su pedido a [orders.kylt-de@san-group.com](mailto:orders.kylt-de@san-group.com) y facilite la siguiente información:

- Dirección de entrega
- Dirección de facturación
- Teléfono de contacto del comprador
- Nombre y número de teléfono del usuario final (si es diferente)
- Número de pedido
- Nombre del producto y número de catálogo
- Cantidad y tamaño de los productos
- Indique si su cuenta está exenta de IVA

## 13. HISTORIAL DE REVISIONES

Revisión	Estado	Enmiendas
Rev010	Jul 2023	válido a partir del 1 de agosto de 2023: Exclusión de Kylt® DNA Extraction-Mix II, nueva disposición para la evaluación de pruebas.
Rev011	Jan 2024	Adición de la cepa vacunal CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq- (presente en la vacuna comercial Primun Salmonella E), que también se detectará en el canal SEV2 (canal Cy5) junto con la vacuna AviPro Salmonella. El color de la tapa de SEf PC es rojo-blanco.
Rev012	June 2025	Nueva presentación/diseño; estado de la revisión y contenido alineados con la versión inglesa; corregido el número de artículo erróneo en el capítulo "2. Contenido del kit", logotipo TÜV cambiado

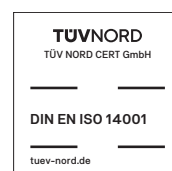
**Producción:** SAN Group Biotech Germany GmbH · Muehlenstrasse 13 · 49685 Hoeltinghausen · Alemania  
[www.kylt.eu](http://www.kylt.eu) · [kylt-de@san-group.com](mailto:kylt-de@san-group.com)

El desarrollo, la producción y la distribución de los diagnósticos in vitro están certificados según la norma ISO 14001:2015 y ISO 9001:2015.

KYLT® es una marca registrada.

Solo para uso in vitro. Los requisitos reglamentarios varían según el país, por lo que es posible que estos productos no estén disponibles en su zona geográfica.

© 2025 SAN Group Biotech Germany GmbH. Todos los derechos reservados. KYLT® es una marca comercial de SAN Group Biotech Germany GmbH.

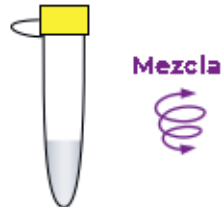




# EL PROTOCOLO DE UN VISTAZO CONFIGURACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL

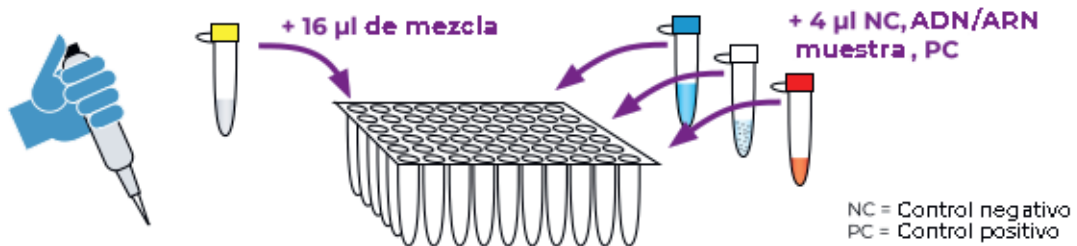
## 1

Mezcla vorticial por pulsos y rotación hacia abajo



## 2

Dispensar mezcla y añadir 4 µl NC, ADN/ARN de muestra, PC



## 3

Sellar las cavidades, centrifugar (recomendado) y poner en marcha el termociclador



## 4

Análisis

