

KYLT[®]

SAN[®]
VET



KYLT[®] SE DIVA 2

**DETEKCJA METODĄ PCR W CZASIE RZECZYWI-
STYM**

i Produkt przeznaczony wyłącznie do diagnostyki weterynaryjnej
in vitro.

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

Passion for Innovation



INSTRUKCJA UŻYTKOWANIA

qPCR.SE DIVA 2.02, Rev012, June 2025

KYLT® SE DIVA 2

Detekcja metodą PCR w czasie rzeczywistym

1. INFORMACJE OGÓLNE

Zestawy są przeznaczone do wykrywania wymienionych żywych szczepów szczepionkowych (dalej "SEV", lub "SEV2") *Salmonella Enteritidis* (SE) i ich różnicowanie od szczepów terenowych (SEf):

- Nazwa szczepu: Sm24/Rif12/Ssq
- Nazwa dostępnej na rynku szczepionki: AviPro SALMONELLA VAC E (i AviPro SALMONELLA DUO, proszę zwrócić uwagę na poniższe informacje, Nazwa producenta: Elanco (Lohmann Animal Health GmbH))
- Nazwa szczepu: CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-
- Nazwa dostępnej na rynku szczepionki: Primun Salmonella E (Nazwa producenta: CALIER)





Charakterystyka	Opis
Nazwa artykułu	Kylt® SE DIVA 2 LD 100, Kylt® SE DIVA 2 LD 25
Organizm	Bakteria
Cząsteczka docelowa	DNA
Technologia	Real-Time PCR
Gatunek zwierzęcia	Drób (kurczak, indyk)
Wstępne testy z wykorzystaniem	<i>Salmonella</i> spp. 2.0
Rodzaj próbki	<ul style="list-style-type: none">■ próbki wstępnie wzbogacone, przetestowane pozytywnie na obecność <i>Salmonella</i> spp. (Ct < 25), materiału kolonii przetestowanego pozytywnie na obecność <i>Salmonella</i> spp., otrzymanego w procesie hodowlanym (np. DIN EN ISO 6579), W przypadku próbek z dodatnim wynikiem Ct > 25 w badaniu przesiewowym <i>Salmonella</i> spp. należy przeprowadzić drugi etap wzbogacania lub powtórzyć analizę przy użyciu materiału kolonii z hodowli mikrobiologicznej.
Kanał FAM docelowy (520 nm)	<i>Salmonella Enteritidis</i>
Kanał Cy5 docelowy (670 nm)	SE Sm24/Rif12/Ssq i CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-
Kanał TXR docelowy (620 nm)	Szczep terenowy SE
Profil temperatury	Kylt® Profil I lub Kylt® Profil II

- Zestawy te zostały opracowane do użytku przez przeszkolony personel laboratoryjny zgodnie ze standardowymi procedurami. Należy ściśle przestrzegać niniejszej instrukcji użytkowania.
- Zestaw może być również używany z pewnymi ograniczeniami do analizy wstępnie wzbogaconych próbek z dodatnim wynikiem badania na obecność *Salmonella* spp. w buforowanej wodzie peptonowej. W tym przypadku istotne jest tylko wykrycie szczepu szczepionkowego, wszelkie wskazania na obecność szczepu terenowego SE należy potwierdzić metodami izolacji, np. ISO 6579 i aglutynacji Kauffmanna-White'a.
Uwaga: Jeśli zestaw ma być używany do badania stad, które zostały zaszczepione szczepionką AviPro SALMONELLA DUO można go stosować wyłącznie na materiale kolonii przetestowanym pozytywnie na obecność *Salmonella* spp., otrzymanym w procesie hodowlanym.

2. DETEKCJA METODĄ PCR W CZASIE RZECZYWISTYM

Amplifikowane fragmenty genów docelowych są wykrywane w czasie rzeczywistym za pomocą fluorescencyjnie znakowanych sond podczas reakcji PCR (Real-Time PCR). Ich emitowana fluorescencja jest oddzielnie mierzona optycznie przez termocykler do analizy PCR w czasie rzeczywistym. Status próbki pod kątem obecności konkretnego patogenu można ocenić, biorąc pod uwagę wszystkie amplifikowane cele w każdej próbce oraz kontrole negatywne i pozytywne w każdym przebiegu. Podczas PCR w czasie rzeczywistym geny docelowe amplifikowane przez odpowiednie pary starterów w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

3. ZAWARTOŚĆ ZESTAWU

Odczynnik	Kolor pokrywki	100 reakcji Nr art. 31161	25 reakcji Nr art. 31162	Przechowywać w temp.
Mieszanka reakcyjna	 Fioletowy	4× 450 µl	1× 450 µl	<= -18°C
Kontrola dodatnia SEf	 Czerwono-biały	2× Lyoph. a final 50 µl	1× Lyoph. a final 50 µl	<= -18°C
Kontrola dodatnia SEV2	 Czerwony	2× Lyoph. a final 50 µl	1× Lyoph. a final 50 µl	<= -18°C
Kontrola ujemna	 Niebieski	1× 1 ml	1× 1 ml	<= -18°C

4. WARUNKI PRZECHOWYWANIA

- Przygotować porcje odczynników w taki sposób, aby cykle zamrażania-rozmrażania zostały ograniczone do maksymalnie trzech
- Komponenty zestawu należy zużyć w ciągu wskazanego okresu trwałości (patrz etykieta na pudełku).
- Nie mieszać komponentów pochodzących z różnych partii.
- **Mieszankę reakcyjną** należy przechowywać poza zasięgiem intensywnego światła.

5. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- Przed pierwszym użyciem należy rozpuścić odczynniki do **kontroli dodatniej**: dodać 50 µl odczynnika kontroli ujemnej do fiolki, krótko inkubować w temperaturze pokojowej i dokładnie wymieszać przez kilkukrotne worteksowanie.

6. WYMAGANE WYPOSAŻENIE, URZĄDZENIA I MATERIAŁY EKSPLOATACYJNE

- Termocyklery do analizy PCR w czasie rzeczywistym, które wykrywają emitowaną fluorescencję (Należy pamiętać, że domyślna opcja normalizacji względem ROX (np. przy użyciu cyklerów ABI) musi być wyłączona)
- Kompatybilne probówki lub płytki PCR.
- Zestaw do oczyszczania zapewniający wystarczająco wysokie stężenie DNA/RNA wolnego od inhibitorów (np. akcesoria Kylt RNA / DNA Purification)
- Mikrowirówka stołowa.
- Vortex.
- Mikropipety z regulacją objętości w odpowiednim zakresie.
- Dopasowane końcówki pipetowe PCR-clean z filtrami.
- Certyfikowane materiały jednorazowe niezawierające nukleaz ("PCR-clean").
- Bezpułdrowe rękawice ochronne. Rękawice należy nosić podczas całej procedury badawczej. Rękawice należy regularnie zmieniać, zwłaszcza po ich zachlapaniu lub gdy podejrzewane jest zanieczyszczenie.

7. REAKCJE KONTROLNE

- **Kontrola dodatnia** umożliwia kontrolę specyficzności i wydajności odczynników oraz samej reakcji, m.in. wydajności analizy PCR w czasie rzeczywistym oraz termocyklera PCR.
- **Kontrola ujemna** pozwala na wykluczenie zanieczyszczeń. Badanie próbki jest ważne tylko wtedy, gdy wykonana zostanie zarówno kontrola dodatnia, jak i ujemna i zostanie przeprowadzona weryfikacja pod kątem prawidłowości każdego przebiegu badania PCR w czasie rzeczywistym.

8. KONFIGURACJA REAKCJI

- **Uwaga:** Przed użyciem zestawu należy wykonać badanie przesiewowe próbek pod kątem obecności *Salmonella* spp., dodatkowe informacje można znaleźć w odpowiednich instrukcjach użytkownika. Tylko potwierdzone próbki *Salmonella* spp.-dodatnie mogą być analizowane za pomocą zestawu. Wstępne wzbogacanie kultur i ekstrakcję DNA należy przeprowadzić zgodnie z instrukcją właściwą dla stosowanej metody PCR potwierdzającej obecność *Salmonella* spp. W ten sposób sprawdzana i potwierdzana jest również jakość ekstraktu DNA wykorzystywanego w tej metodzie.
- Przed każdym użyciem należy krótko wymieszać i odwirować używane odczynniki.
- Aby określić całkowitą liczbę potrzebnych reakcji, należy policzyć liczbę próbek i dodać co najmniej dwie kolejne: jedną dla kontroli ujemnej i jedną dla każdej kontroli dodatniej.
- **Mieszanina reakcyjna** jest gotowa do użycia - umieścić 16 µl w każdej probówce PCR lub studzience (zagłębieniu) na płytce.
- **Mieszanina reakcyjna** powinna mieć możliwie jak najkrótszy kontakt ze światłem (słonecznym). Zaraz po użyciu należy umieścić ją w odpowiedniej temperaturze przechowywania.
- Podczas pipetowania próbek i kontroli należy unikać tworzenia się pęcherzyków powietrza.
- Umieścić 4 µl **kontroli ujemnej** w odpowiedniej studzience, zamykając studzienki pojedynczo, o ile to możliwe.
- Umieścić 4 µl **preparatu DNA** w odpowiedniej studzience, zamykając studzienki pojedynczo, o ile to możliwe.
- Umieścić 4 µl roztworu **kontroli dodatniej SEf** w odpowiedniej studzience i zamknąć studzienkę. Następnie umieścić 4 µl **kontroli dodatniej SEV2** w odpowiedniej studzience i zamknąć studzienkę
- Po przygotowaniu wszystkich reakcji należy zamknąć studzienki i krótko odwirować.
- Umieścić płytkę/probówki w termocyklerze do PCR w czasie rzeczywistym i przeprowadzić test za pomocą Kylt Profile II lub Kylt Profile I.
- Kylt Profile II umożliwia jednoczesne wykonywanie badania z użyciem tego i większości innych zestawów Kylt do analizy qPCR.
- Kylt Profile I umożliwia jednoczesne wykonywanie badania z użyciem tego i większości innych zestawów Kylt do analizy qPCR, a także zestawów Kylt do analizy RT-qPCR.
- W przypadku połączonego badania Real-Time (RT-)PCR należy upewnić się, że wykrywane są wszystkie wymagane kanały.
- Należy postępować zgodnie z zaleceniami producenta termocyklera Real-Time PCR.

Kylt® Profile II

Krok	Opis	Temperatura	Czas trwania
1	Aktywacja polimerazy	95 °C	10 min
2	Denaturacja	95 °C	15 s
3	Hybrydyzacja i wydłużenie	60 °C	1 min
4	Wykrywanie fluorescencji	kanały / długości fal patrz strona 2	

} 42 cykle

Kylt® Profile I

Krok	Opis	Temperatura	Czas trwania
1	Odwrotna transkrypcja	50 °C	10 min
2	Aktywacja polimerazy	95 °C	1 min
3	Denaturacja	95 °C	10 s
4	Hybrydyzacja i wydłużenie	60 °C	1 min
5	Wykrywanie fluorescencji	kanały / długości fal patrz strona 2	

} 42 cykle

9. OGÓLNA OCENA PRZEBIEGU PCR I KONTROLA JAKOŚCI

- Idealna dodatnia krzywa PCR rozpoczyna się fazą liniową, następnie przechodzi w fazę wzrostu wykładniczego i kończy się fazą plateau.
- Linia bazowa (baseline) w reakcji PCR w czasie rzeczywistym opisuje ten odcinek krzywej amplifikacji, w którym nie jest jeszcze widoczna specyficzna amplifikacja produktu - a więc przed początkiem fazy wykładniczej PCR.
- Można korzystać z automatycznej analizy w oprogramowaniu termocyklera. Proszę jednak zwrócić uwagę na możliwość występowania artefaktów, aby je zidentyfikować.
- Wartość proggu (threshold) przy ustawieniu ręcznym powinna znajdować się wystarczająco blisko linii bazowej, aby obejmowała wszystkie krzywe wykazujące wyraźną fazę wykładniczą, a jednocześnie wykluczała niespecyficzne przyrosty fluorescencji.
- Punkt przecięcia krzywej z linią proggu to wartość Ct. Im niższa wartość Ct, tym wyższe jest początkowe stężenie cząsteczek docelowych w próbce na początku testu.

10. OCENA BADANIA - REAKCJE KONTROLNE

- Wynik badania PCR w czasie rzeczywistym jest prawidłowy tylko jeśli krzywe reakcji kontrolnych można ocenić w następujący sposób:
- Aby prawidłowo zinterpretować uzyskane wyniki, konieczne jest ustalenie, która szczepionka została zastosowana w stadzie.
- **Uwaga:** W próbkach z wynikiem dodatnim w kanale TXR lub Cy5 oraz ujemnym w kanale FAM nie można wykryć serotypu *Salmonella Enteritidis*, ani szczepu szczepionkowego SE. Jednak w próbce może być obecny inny serotyp bakterii z rodzaju *Salmonella*.

Reakcje kontrolne	Kanały specyficzne dla patogenów					
	FAM		TXR		Cy5	
Kontrola ujemna	ujemny	Ct > 35	ujemny	Ct > 35	ujemny	Ct > 35
Kontrola dodatnia SEF	dodatni	Ct ≤ 35	dodatni	Ct ≤ 35	ujemny	Ct > 35
Kontrola dodatnia SEV2	dodatni	Ct ≤ 35	ujemny	Ct > 35	dodatni	Ct ≤ 35

11. OCENA BADANIA – PRÓBKI

Cel	Kanał	Sygnał			
<i>Salmonella Enteritidis (SE)</i>	FAM	dodatni	dodatni	dodatni	ujemny
Szczep terenowy SE (SEf)*	TXR	ujemny	dodatni	ujemny	dodatni / ujemny
SEV2 (szczep szczepionkowy SE Sm24/ Rif12/Ssq lub CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-)	Cy5	dodatni	ujemny	ujemny	dodatni / ujemny
Próbka to Salmonella Enteritidis		dodatni	dodatni	dodatni nie można określić typu	ujemny
Próbka to SEf*		ujemny	dodatni	ujemny	ujemny
Próbka est szczep szczepionkowy SE Sm24/Rif12/ Ssq lub CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-		dodatni	ujemny	ujemny	ujemny

* Obejmuje to również wykrywanie szczepów terenowych SE, a także żywych szczepów szczepionkowych innych niż Sm24/Rif12/Ssq lub CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-. W przypadku bezpośredniego użycia próbek wzbogaconych w buforowaną wodę peptonową prawidłowe są tylko wyniki wykrywania szczepów szczepionkowych Sm24/Rif12/Ssq i CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-. Każde wskazanie szczepu terenowego musi zostać potwierdzone metodami hodowlanymi i biochemicznymi.

- **Próbka** ma wynik **ujemny dla SE, SEf i SEV2** jeśli jej krzywa FAM, Cy5 i TXR jest ujemna.
- **Próbka** ma wynik **dodatni dla serotypu Salmonella Enteritidis** jeśli jej krzywa FAM jest dodatnia, niezależnie od przebiegu krzywych Cy5 i TXR. Jeśli wynik próbki jest dodatni w kanale FAM i ujemny w kanałach Cy5 i TXR, nie można dalej zróżnicować szczepu SE obecnego w próbce. W takim przypadku analizę należy powtórzyć przy użyciu materiału kolonii otrzymanego w procesie hodowlanym wg. standardu ISO 6579.
- **Próbka** ma wynik **dodatni dla SEV2 (szczep szczepionkowy Sm24/Rif12/Ssq lub CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-)** jeśli jej krzywe FAM i Cy5 są dodatnie (Ct < 30).
- **Próbka** ma wynik **dodatni dla SEf** jeśli jej krzywe FAM i TXR są dodatnie (Ct < 30).
- **Uwaga:** Wynik ten obejmuje również wykrycie szczepów terenowych SE, a także żywych szczepów szczepionkowych innych niż SE Sm24/Rif12/Ssq lub CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq-.
- Jeśli ta metoda wykrywania używa się bezpośrednio do badania próbek wzbogaconych o buforowaną wodę peptonową, prawidłowy wynik uzyskuje się tylko w przypadku wykrywania szczepu szczepionkowego. Każde wskazanie zakażenia bakteriami SEf trzeba potwierdzić metodami hodowlanymi i biochemicznymi (np. ISO 6579 i aglutynacji Kauffmanna-White'a).
- Jeśli krzywe FAM, TXR i Cy5 mają przebieg dodatni (CT<30), możliwe jest **podwójne zakażenie SEV2 i SEf lub SEV2 i innym serotypem Salmonella**. Podwójną infekcję potwierdza się metodami hodowlanymi i biochemicznymi (np. ISO 6579 i aglutynacji Kauffmanna-White'a).
- Wprowadzanie danych próbki, analizę PCR w czasie rzeczywistym, końcową analizę jakościową oraz przygotowanie dokumentacji ułatwia oprogramowanie Kylt - aby uzyskać więcej informacji, prosimy o kontakt.

12. INFORMACJE DOTYCZĄCE ZAMAWIANIA

Obowiązują ogólne warunki handlowe SAN Group Biotech Germany GmbH (www.anicon.eu). Zamówienia należy przysyłać na adres orders.kylt-de@san-group.com, podając następujące informacje:

- Adres do faktury
- Adres dostawy
- Numer telefonu kontaktowego nabywcy
- Nazwa użytkownika końcowego i numer telefonu (jeśli jest inny)
- Numer zamówienia
- Nazwa produktu i numer katalogowy
- Ilość i wielkość produktów
- Określ, czy jesteś zwolniony z podatku VAT

13. HISTORIA ZMIAN

Nr wersji. (Rev)	Status	Zmiany
Rev010	Jul 2023	obowiązuje od 01 sierpnia 2023 r.: usunięcie Kylt® DNA Extraction-Mix II, nowy układ do oceny testu.
Rev011	Jan 2024	dodanie szczepu szczepionki CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq- (obecnego w dostępnej na rynku szczepionce Primun Salmonella E), który będzie również wykrywany w kanale SEV2 (kanał Cy5) wraz ze szczepionką AviPro Salmonella, pokrywka SEf PC ma kolor czerwono-biały.
Rev012	June 2025	Nowy układ/wygląd; stan aktualizacji i treść wszystkich dostępnych języków dostosowane do wersji angielskiej; poprawiono błędny numer artykułu w rozdziale „2. Zawartość zestawu”, zmieniono logo TÜV

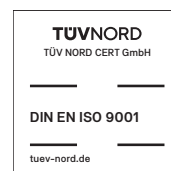
Producent: SAN Group Biotech Germany GmbH · Muehlenstrasse 13 · 49685 Hoeltinghausen · Niemcy
www.kylt.eu · kylt-de@san-group.com

Opracowywanie, produkcja i dystrybucja produktów diagnostycznych invitro jest objęta certyfikatem ISO 9001:2015 i ISO 14001:2015.

KYLt® jest zastrzeżonym znakiem towarowym.

Wyłącznie do użytku weterynaryjnego. Wyłącznie do użytku in vitro. Wymogi prawne różnią się w zależności od kraju. Nie wszystkie produkty opisane w niniejszym dokumencie mogą być dostępne w danym regionie geograficznym.

© 2025 SAN Group Biotech Germany GmbH. Wszelkie prawa zastrzeżone. Wymienione znaki towarowe są własnością SAN Group Biotech Germany GmbH lub ich odpowiednich właścicieli.

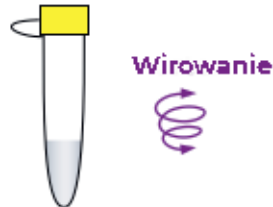




PROTOKÓŁ W SKRÓCIE KONFIGURACJA ANALIZY REAL-TIME PCR

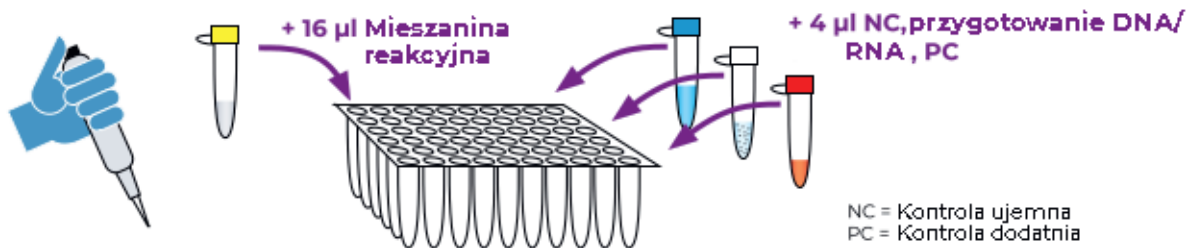
1

Wirowanie pulsacyjne i izolacja



2

Odmierzyć mieszaninę reakcyjną i umieścić 4 μ l NC, preparatu DNA/RNA, PC



3

Zamknąć studzienki, odwirować (zalecane) i uruchomić cykl



4

Analiza

