

KYLT[®]

SAN[®]
VET



KYLT[®] E. COLI STX1, STX2, EAE

REAL-TIME PCR NACHWEIS

i Nur für die Lebens- und Futtermitteldiagnostik.

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

Passion for Innovation



GEBRAUCHSANWEISUNG

FS.qPCR.STEC.02, Rev003, April 2025

KYLT®

E. COLI STX1, STX2, EAE

Real-Time PCR Nachweis

1. ALLGEMEIN




Eigenschaft	Beschreibung
Artikelname	Kylt® Stx1, Stx2, eae FS 100, Kylt® Stx1, Stx2, eae FS 25
Name des Erregers	E. coli Virulenzfaktor Stx1 (Shigatoxin 1), E. coli Virulenzfaktor Stx2 (Shigatoxin 2, inkl. Stx2f), E. coli Virulenzfaktor eae (E. coli intimin)
Verursachte Krankheit	E. coli-Infektion
Organismus	Bakterium
Zielmolekül	DNA
Technologie	Real-Time PCR
Interne Kontrolle	Interne Amplifikationskontrolle (IAC; exogen)
Probenart	<ul style="list-style-type: none">■ Voranreicherungs-Proben■ Isolate aus kulturellen Verfahren
Ziel HEX-Kanal (550 nm)	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)
Ziel FAM-Kanal (520 nm)	Stx1
Ziel Cy5-Kanal (670 nm)	eae
Ziel TXR-Kanal (620 nm)	Stx2
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.

2. REAL-TIME PCR

In der Real-Time PCR werden die Zielgene durch spezifische Primerpaare in der Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) amplifiziert. 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.

3. KIT-INHALT

Reagenz	Deckelfarbe	100 Reaktionen Artikelnr. 31734	25 Reaktionen Artikelnr. 31735	Lager- temperatur
Reaktions-Mix	 Grün	4× 450 µl	1× 450 µl	<= -18°C
Positivkontrolle	 Rot	4× Lyoph. a final 50 µl	2× 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.
- Aufreinigungskit, 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.
- Die **Interne Amplifikationskontrolle** ist im Reaktionsmix enthalten. Sie wird in jeder einzelnen Reaktion amplifiziert, um gegebenenfalls inhibitorische Effekte des DNA-Extrakts auf die Real-Time PCR zu erfassen und somit richtig-negative Ergebnisse zu verifizieren.

8. REAKTIONS-SETUP

- 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 **Positivkontrolle** in die entsprechende Kavität geben.
- 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.	} 42 Zyklen
3	Denaturierung	95 °C	10 Sek.	
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:

Kontrollreaktionen	Kanal			
	HEX		Cy5 / FAM / TXR	
	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)		Pathogen-spezifische Kanäle	
Negativkontrolle	positiv	Ct ≤ 40	negativ	Ct > 42
Positivkontrolle	positiv	Ct ≤ 40	positiv	Ct > 15 und ≤ 35

11. TESTAUSWERTUNG - PROBEN

Ziel	Kanal	Signal					
Interne Amplifikationskontrolle (IAC)	HEX	positiv	positiv / negativ	positiv / negativ	positiv / negativ	positiv / negativ	negativ
<i>E. coli Stx1</i>	FAM	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	negativ
<i>E. coli Stx2</i>	TXR	negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
<i>E. coli eae</i>	Cy5	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ
Die Probe ist <i>E. coli Stx1</i>		negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	inhibiert
Die Probe ist <i>E. coli Stx2</i>		negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	
Die Probe ist <i>E. coli eae</i>		negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	

- Die **Interne Amplifikationskontrolle (IAC)** ist positiv: Ct-Wert ≤ 40.
- Der **Pathogen-spezifische Kanal** ist positiv: Ct-Wert ≤ 42.
- Bei der Untersuchung von Isolaten gilt: Der **Pathogen-spezifische Kanal** ist positiv bei Ct-Wert ≤ 30.
- Im Falle einer inhibierten Probe kann der Test mit einer Verdünnung der DNA-Probe im Verhältnis von z. B. 1:10 wiederholt werden. Die Negativkontrolle dient hierbei als Verdünnungsmedium. Vorzugsweise wird die gesamte DNA-Präparation der Probe mit weniger Originalmaterial wiederholt.
- 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
Rev002	April 2021	Neues Layout, Deckelfarbe des Reaktions-Mix auf grün geändert (ab Charge: 20STEC:01), Lagertemperatur der Reagenzien $\leq -18\text{ °C}$
Rev003	April 2025	Neues Layout/Design; geändertes Volumen von Reaktions-Mix und Positivkontrolle; geändertes Reaktions-Setup (geändert von 18 μl (Reaktions-Mix) + 2 μl (z.B. Probe) auf 16 μl + 4 μl); Cut-off für die Auswertung von Isolaten hinzugefügt; 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 KYLT® In-Vitro Diagnostika ist 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.

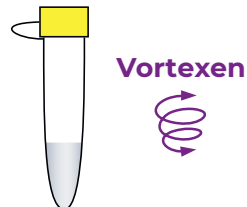




KURZANLEITUNG REAL-TIME PCR SETUP

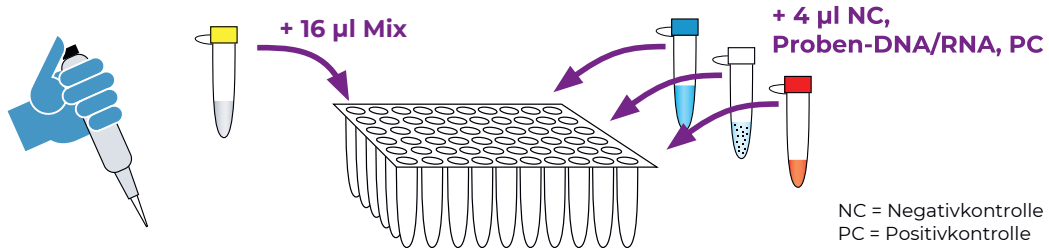
1

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

