

# KYLT<sup>®</sup>

**SAN**<sup>®</sup>  
VET



## **KYLT<sup>®</sup> DICHELOBACTER NODOSUS TYPING**

**REAL-TIME PCR NACHWEIS**

**i** Nur für den In-vitro-Veterinärgebrauch.

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

**Passion for Innovation**



# KYLT®

## DICHELOBACTER NODOSUS TYPING

### Real-Time PCR Nachweis

#### 1. ALLGEMEIN





Eigenschaft	Beschreibung
Artikelname	Kylt® Dichelobacter nodosus typing LD 100, Kylt® Dichelobacter nodosus typing LD 25
Name des Erregers	Dichelobacter nodosus gutartige Stämme, Dichelobacter nodosus virulente Stämme
Verursachte Krankheit	Moderhinke
Organismus	Bakterium
Zielmolekül	DNA
Technologie	Real-Time PCR
Interne Kontrolle	Interne Amplifikationskontrolle (IAC; exogen)
Tierart	Wiederkäuer (Ziege, Schaf)
Probenart	<ul style="list-style-type: none"><li>■ Tupferproben (bspw. Klauen, Zwischenzehbereich /Zwischenklauenbereich / Interdigitalspalt, Gewebe)</li><li>■ Umweltproben (bspw. Schmutz, Staub)</li></ul>
Ziel HEX-Kanal (550 nm)	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)
Ziel Cy5-Kanal (670 nm)	Dichelobacter nodosus gutartige Stämme
Ziel TXR-Kanal (620 nm)	Dichelobacter nodosus virulente Stämme
Poolen	Bis zu 10 Proben
Temperaturprofil	Kylt® Profil I oder Kylt® Profil II

Dieses Produkt wurde für den Gebrauch durch geschultes Laborpersonal nach standardisierten Verfahren entwickelt. Dieser Gebrauchsinformation ist strikt zu folgen.

## 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. 31766	25 Reaktionen Artikelnr. 31767	Lager- temperatur
2x qPCR-Mix	 Transparent	4× 280 µl	1× 280 µl	<= -18°C
Primer-Sonden-Mix	 Orange	4× Lyoph. final a 150 µl	1× Lyoph. final a 150 µl	<= -18°C
Positivkontrolle	 Rot	1× 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 **Primer-Sonden-Mix** muss lichtgeschützt gelagert und verwendet werden.

## 5. REAGENZENVORBEREITUNG

- 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.
- Vor dem ersten Gebrauch wird der **Primer-Sonden-Mix** rehydriert: je 150 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 (bzw. Primer-Sonden-Mix) 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. REAKTIONSETUP

- 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.
- Bereiten Sie den Master-Mix unter Verwendung der unten aufgeführten Komponenten vor.
- Den fertigen **Master-Mix** vortexen, zentrifugieren und davon jeweils 16 µl in jedes der PCR-Gefäße oder Plattenvertiefungen ("Kavitäten") geben.

Reagenz	Volumen (µl)	
	pro Reaktion	Beispiel n = 7
2x qPCR-Mix	10 µl	70 µl
Primer-Sonden-Mix	6 µl	42 µl
<b>Gesamtvolumen Master-Mix</b>	<b>16 µl</b>	<b>112 µl</b> <b>(16 µl pro Reaktion vorlegen)</b>
DNA (Negativkontrolle / Proben-DNA / Positivkontrolle)	4 µl	
<b>Gesamtvolumen pro Reaktion</b>	<b>20 µl</b>	

- Den 2x RT-qPCR-Mix, Primer-Sonden-Mix und den vorbereiteten Master-Mix so kurz wie möglich dem (Sonnen-) Licht aussetzen und sofort wieder bei der richtigen Temperatur lagern.
- 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:

Kontroll-reaktionen	Kanal					
	HEX		Cy5		TXR	
	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)		Pathogen-spezifischer Kanal		Pathogen-spezifischer Kanal	
Negativkontrolle	<b>positiv</b>	<b>Ct ≤ 40</b>	negativ	Ct > 42	negativ	Ct > 42
Positivkontrolle	<b>positiv</b>	<b>Ct ≤ 40</b>	<b>positiv</b>	<b>Ct &gt; 15 und ≤ 35</b>	<b>positiv</b>	<b>Ct &gt; 15 und ≤ 35</b>

## 11. TESTAUSWERTUNG - PROBEN

Ziel	Kanal	Signal				
Interne Amplifikationskontrolle (IAC)	HEX	<b>positiv</b>	positiv / negativ	positiv / negativ	positiv / negativ	negativ
<i>Dichelobacter nodosus</i> gutartige Stämme	Cy5	negativ	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv</b>	negativ
<i>Dichelobacter nodosus</i> virulente Stämme	TXR	negativ	negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ
Die Probe ist für <b><i>D. nodosus</i> gutartige Stämme</b>		negativ	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv</b>	inhibiert
Die Probe ist für <b><i>D. nodosus</i> virulente Stämme</b>		negativ	negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	

- Die **Interne Amplifikationskontrolle (IAC)** ist positiv: Ct-Wert ≤ 40.
- Der **Pathogen-spezifische Kanal** ist positiv: Ct-Wert ≤ 42.
- 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.

## 12. BESTELLINFORMATIONEN

Es gelten die allgemeinen Geschäftsbedingungen der SAN Group Biotech Germany GmbH ([www.anicon.eu](http://www.anicon.eu)). Um einen schnellen und effizienten Service zu gewährleisten, senden Sie Ihre Bestellung bitte an [orders.kylt-de@san-group.com](mailto: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	December 2025	Neues Layout/Design inklusive inhaltlicher Zusammenfassungen bzw. Kürzungen der Kapitel; geänderter Kit-Inhalt (2x qPCR-Mix und Primer-Sonden-Mix anstelle des Reaktions-Mixes) und dadurch angepasstes Reaktions-Setup; geändertes TÜV-Logo und ergänzte Zertifizierung

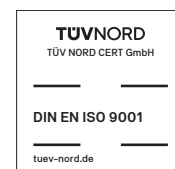
**Produktion:** SAN Group Biotech Germany GmbH · Mühlenstrasse 13 · 49685 Höltinghausen · Deutschland  
[www.kylt.eu](http://www.kylt.eu) · [kylt-de@san-group.com](mailto:kylt-de@san-group.com)

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.

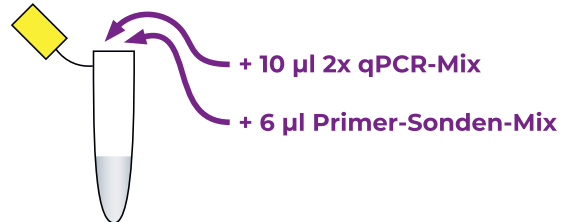




# KURZANLEITUNG REAL-TIME PCR SETUP

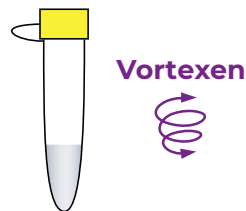
## 1

Bereiten Sie einen Master-Mix vor



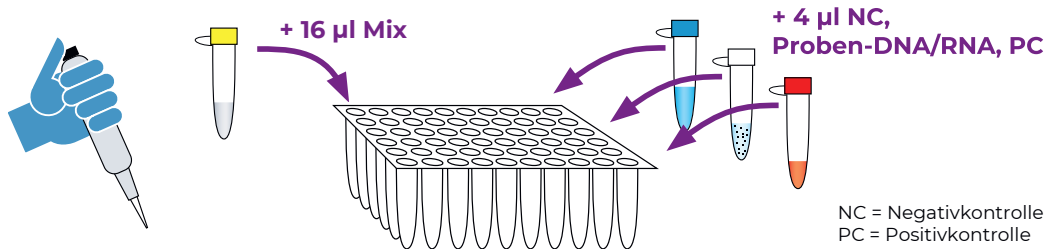
## 2

Vortexen und zentrifugieren



## 3

Master-Mix dispensieren und 4 µl NC, Proben-DNA/RNA, PC zugeben



## 4

Versiegeln, zentrifugieren (empfohlen), Thermocycler starten



## 5

Analyse

