

KYLT®

SAN
VET



KYLT® MYCOPLASMA IOWAE

REAL-TIME PCR NACHWEIS

i Nur für die In-vitro-Veterinärdiagnostik.

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

Passion for Innovation



GEBRAUCHSANWEISUNG

qPCR.MI.02, Rev004, November 2024

KYLT[®] MYCOPLASMA IOWAE

Real-Time PCR Nachweis

1. ALLGEMEIN





Eigenschaft	Beschreibung
Artikelname	Kylt [®] MI LD 100, Kylt [®] MI LD 25
Name des Erregers	Mycoplasma iowae
Erreger auch bekannt als	MI
Verursachte Krankheit	Mykoplasmosen
Organismus	Bakterium
Zielmolekül	DNA
Technologie	Real-Time PCR
Interne Kontrolle	Interne Amplifikationskontrolle (IAC; exogen)
Tierart	Geflügel (Huhn, Pute)
Probenarten	<ul style="list-style-type: none">■ Gewebe und Organe (bspw. Lunge, Trachea)■ Tupferproben (bspw. Nasal, Kloakal, Choanal, Tracheal, Lunge, Bindehaut, Luftsäcke)■ Isolate aus kulturellen Verfahren
Ziel HEX-Kanal (550 nm)	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)
Ziel FAM-Kanal (520 nm)	Mycoplasma iowae
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. 31026	25 Reaktionen Artikelnr. 31027	Lager- temperatur
2x qPCR-Mix	 Transparent	4× 280 µl	1× 280 µl	<= -18°C
Primer-Probe-Mix	 Orange	4× Lyoph. a final 150 µl	1× Lyoph. a final 150 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 **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).
- 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.
- Zertifizierte Nuklease-freie (PCR-rein) Verbrauchsmaterialien.
- Kompatible PCR-Platten, Streifen oder einzelne Gefäße.
- Passende PCR-reine Pipettenspitzen mit Filtern.
- 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.
- Bestehen Zweifel an einer korrekten Probennahme, kann die parallele Untersuchung der Proben mittels einer entsprechenden Real-Time PCR, welche spezifisch für Referenzgene (eng.: „housekeeping genes“) der jeweiligen Tierart ist, erfolgen (mit z. B. **Kytl Host Cells**).

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 Kylv 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
Gesamtvolumen Master-Mix	16 µl	112 µl (16 µl pro Reaktion vorlegen)
DNA (Negativkontrolle / Proben-DNA / Positivkontrolle)	4µl	
Gesamtvolumen pro Reaktion	20 µl	

- 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 Kylv Profil II oder Kylv Profil I wie unten angegeben gestartet.
- Mit Kylv Profil II können diese und die meisten anderen Kylv qPCR-Nachweisverfahren gleichzeitig in einem einzigen PCR-Lauf durchgeführt werden.
- Kylv Profil I ermöglicht die Kombination von Läufen dieser und den meisten anderen Kylv 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.
3	Annealing & Extension	60 °C	1 Min.
4	Fluoreszenzmessung	Kanäle / Wellenlängen (siehe S. 2)	

} 42 Zyklen

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.
4	Annealing & Extension	60 °C	1 Min.
5	Fluoreszenzmessung	Kanäle / Wellenlängen (siehe S. 2)	

} 42 Zyklen

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 Cycluser 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		FAM	
	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)		Pathogen-spezifischer Kanal	
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	negativ
<i>Mycoplasma iowae</i>	FAM	negativ	positiv	negativ
Die Probe ist <i>Mycoplasma iowae</i>		negative	positive	inhibited

- 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.
- 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

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
Rev003	June 2019	Layout
Rev004	November 2024	Neues Format/Design, Geänderter Kit-Inhalt (2x qPCR-Mix und Primer-Sonden-Mix anstelle des Reaktions-Mixes), geänderter Ct-Wert im HEX-Kanal für ein negatives Ergebnis

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.

© 2024 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.

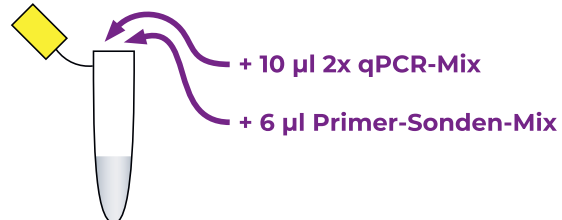




KURZANLEITUNG REAL-TIME PCR SETUP

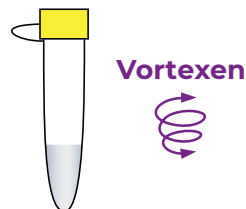
1

Bereiten Sie einen Master-Mix vor



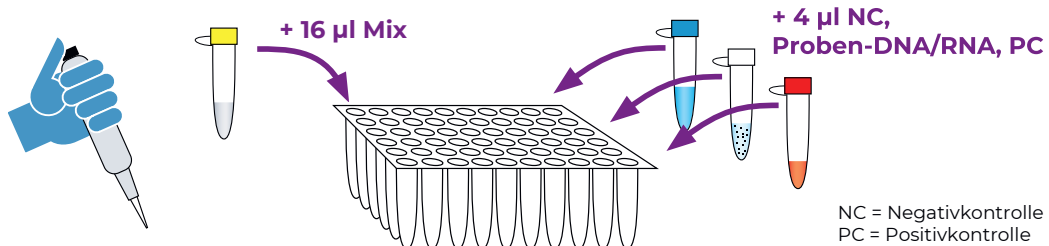
2

Vortexen und zentrifugieren



3

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



4

Versiegeln, zentrifugieren (empfohlen), Thermocycler starten



5

Analyse

