

KYLT[®]

SAN[®]
VET



KYLT[®] ASF

**REAL-TIME PCR DETEKTIONSKIT ZUM
NACHWEIS DES VIRUS DER AFRIKANISCHEN
SCHWEINEPEST**

i Nur für *in vitro* Veterinärdiagnostik

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

Passion for Innovation



GEBRAUCHSINFORMATION

qPCR.ASF.02, Rev008, Dezember 2023

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach §11 Abs. 2 TierGesG zugelassen.

Zulassungsnummer: FLI-C 070

KYLT[®] ASF

Real-Time PCR Detektionskit zum Nachweis des Virus der Afrikanischen Schweinepest

Revision	Stand	Beschreibung der Änderungen
Rev008	Dez 2023	Neues Handbuchdesign
Rev007	Jun 2023	Änderung des Firmennamens, Geändertes Layout für die Auswertung der Kontrollreaktionen, Ergänzungen in "F. Ähnliche und ergänzende Produkte"

1. ALLGEMEINES

- Kylt[®] ASF dient dem spezifischen Nachweis von viraler DNA des Virus der Afrikanischen Schweinepest. Es ist für die Analyse von Proben wie Blut, Gewebe, Tupfer und konservierende Transportmedien vom Schwein und Wildschwein geeignet.
- Der qualitative Nachweis mit Kylt[®] ASF basiert auf einer duplex Real-Time PCR: In einem gemeinsamen Reaktionsansatz werden parallel durch spezifische Primerpaare die beiden Zielgene für das Virus der Afrikanischen Schweinepest sowie für die Interne Kontrolle in der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) amplifiziert. Die amplifizierten Zielgen-Fragmente werden während der laufenden PCR-Reaktion anhand fluoreszierender Sonden in Echtzeit detektiert (Echtzeit- oder Real-Time PCR). Die spezifischen Sonden für die Detektion der Zielgen-Fragmente des Virus der Afrikanischen Schweinepest bzw. der Internen Kontrolle sind mit den Fluoreszenz-Farbstoffen FAM bzw. HEX markiert. Die emittierte Fluoreszenz wird separat jeweils optisch durch den Real-Time PCR Thermocycler erfasst. Anhand dieser beiden unabhängigen Analysen im gleichen Reaktionsansatz je Probe sowie anhand der Negativ- und Positivkontrollen je PCR-Lauf wird ein valides, qualitatives Ergebnis zum Afrikanischen Schweinepest Virus-spezifischen Status der Probe erlangt. So kann innerhalb weniger Stunden nach Eingang der Probe ein Ergebnis realisiert werden.
- Dieses Kit ist für den Gebrauch durch geschultes Laborpersonal nach standardisierten Verfahren entwickelt. Diese Gebrauchsinformation muss strikt befolgt werden.

2. REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- Kylt® ASF enthält die folgenden Reagenzien:

Reagenz	Deckel Farbcod	400 Reaktionen Artikelnr. 31329	100 Reaktionen Artikelnr. 31806	25 Reaktionen Artikelnr. 31807	Lagerung
Reaktions-Mix	● grün	16× 450 µl	4× 450 µl	1× 450 µl	≤ -18 °C
Positivkontrolle	● rot	1× 50 µl	4× 50 µl	2× 50 µl	≤ -18 °C
Negativkontrolle	● blau	1× 1 ml	1× 1 ml	1× 1 ml	≤ -18 °C

- Alle Reagenzien werden bei ≤ -18 °C gelagert. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden und die Reagenzien sollten so kurz wie möglich aufgetaut bleiben. Bei regelmäßiger Untersuchung nur weniger Proben sollten entsprechende Aliquots der Reagenzien vor der Lagerung bei ≤ -18 °C vorbereitet werden. Die Aliquots sollten so dosiert sein, dass sie nicht mehr als dreimal eingefroren und aufgetaut werden. Die Negativkontrolle kann alternativ bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden.
- Die Reagenzien dürfen nur bis zu dem auf dem Etikett des Umkartons angegebenen Ablaufdatum verwendet werden. Komponenten verschiedener Chargen sollten nicht kombiniert werden.
- Den **Reaktions-Mix** dunkel lagern und nicht dem direkten (Sonnen-)licht aussetzen.

3. NICHT ENTHALTENE AUSSTATTUNG UND REAGENZIEN

- Diese Detektionsmethode kann auf allen handelsüblichen Real-Time PCR Thermocyclern eingesetzt werden, die die emittierte Fluoreszenz der Farbstoffe FAM und HEX (Emission von 520 und 550 nm) detektieren können. Bitte beachten: die standardmäßige Normalisierung gegen ROX (z.B. bei Thermocyclern des Herstellers Applied Biosystems) muss deaktiviert werden.
- Neben dem Verbrauchsmaterial werden folgende Geräte benötigt, die nicht in Kylt® ASF enthalten sind:
 - DNA-Extraktionskit / -protokoll (z.B. Kylt® RNA / DNA Purification)
 - Tischzentrifuge
 - Vortexer
 - Mikropipetten, geeignet für Volumina von 1 µl bis 1000 µl
 - Zentrifuge für PCR-Reaktionsgefäße und -platten
 - Real-Time PCR Thermocycler
- Ergänzende Kylt® Produkte: Kapitel 6 "Ähnliche und Ergänzende Produkte".
- Wir empfehlen den ausschließlichen Gebrauch von zertifiziert Nuklease-freien Verbrauchsmaterialien sowie von puderfreien Schutzhandschuhen. Handschuhe sind während des gesamten Arbeitsprozesses zu tragen. Die Handschuhe sind möglichst häufig zu wechseln, insbesondere nach Verschütten oder bei Verdacht auf anderweitige Kontaminationen.

4. KONTROLLREAKTIONEN

- Die **Positivkontrolle** ermöglicht es, die Spezifität und Effizienz der Reagenzien und des PCR-Laufes selbst sowie die einwandfreie Funktion der Real-Time RT-PCR und des Real-Time PCR Thermocyclers zu kontrollieren.
- Die **Negativkontrolle** ermöglicht es, den Eintrag von Kontaminationen auszuschließen. Nur wenn sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle in jedem PCR-Lauf angewendet und als valide verifiziert werden, kann der gesamte Lauf in der abschließenden Auswertung als valide bewertet werden.
- Die **Interne Kontrolle** basiert auf der **Detektion von beta-Actin** DNA. Beta-Actin ist in den Zellen des Wirts, von dem die Probe stammt, allgegenwärtig. Die beta-Actin DNA wird in jeder einzelnen Reaktion co-amplifiziert (Fluoreszenz-Farbstoff HEX) und ermöglicht die Bewertung der Probe selbst, der Lagerung und des Transports der Probe, der Aufbereitung und der Real-Time PCR insgesamt.

5. PROTOKOLL (siehe auch Kurzanleitung am Ende dieser Gebrauchsinformation)

- Die Gesamtmethode des Nachweises umfasst folgende Schritte:
 1. Probenvorbereitung
 2. DNA Präparation
 3. Reaktions-Setup und Amplifikation (Real-Time PCR)
 4. Auswertung – Validität und Qualitatives Ergebnis
- Es wird empfohlen, das Protokoll ohne Unterberechnung zu befolgen, um eine potentielle Degradation der vorbereiteten Proben und Reagenzien zu vermeiden. Wenn nötig, können fertige DNA Präparationen bei $\leq -18^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der DNA Präparationen sollte vermieden werden.

5.1. Probenvorbereitung

- Das Mittel ist validiert für das Poolen von bis zu 20 Tupferproben. Für Anwender in Deutschland ist ein Zusammenführen (Poolen) der Proben ausschließlich nach Maßgabe der amtlichen Methodensammlung möglich.
- **Tupfer** sollten in einem ausreichend großen Volumen sterilen Puffers (z.B. 1 ml Kochsalzlösung oder 0,1 x TE) gepoolt werden, indem die Tupfer ausreichend lange eingeweicht und anschließend durch gründliches Vortexen gewaschen werden. Der ausgewaschene Überstand wird für die DNA Präparation genutzt. Alternativ können Einzeltupfer (inkl. z.B. GenoTubes) auch direkt für die DNA Präparation verwendet werden.
- **Gewebe- und Organproben** werden gründlich in sterilem Puffer (siehe oben) homogenisiert und ein ausreichendes Volumen wird für die DNA Präparation genutzt.
- Material aus kultureller Voranreicherung, z.B. **Zellkulturüberstand**, kann direkt für die DNA Präparation verwendet werden.

5.2. DNA Präparation

- Alle Probenmatrizes, inklusive Serum, Blut, Speichel, Tupfer, Gewebe, Organe und Kulturmateriale können mit geeigneten Extraktionskits, wie zum Beispiel Kylt[®] RNA / DNA Purification (siehe Kapitel F "Ähnliche und ergänzende Produkte") oder geeigneten, hauseigenen Methoden aufgereinigt werden.
- Detaillierte Informationen in Bezug auf die DNA Präparation finden sich auch in der Gebrauchsanweisung oder der Arbeitsanweisung für das spezifische Kit.

5.3. Reaktions-Setup und Amplifikation(Real-Time PCR)

- Reaktions-Mix und Negativkontrolle werden vor jedem Gebrauch kurz durch Vortexen gemischt und zentrifugiert.
- Zu Beginn wird die Zahl benötigter PCR-Reaktionen bestimmt: zu der Anzahl der zu untersuchenden Proben werden zwei weitere Reaktionen für die Negativkontrolle und die Positivkontrolle addiert.
- 16 μl **Reaktions-Mix** werden zu jedem PCR-Reaktionsgefäß oder in jede PCR-Plattenvertiefung ("Kavität") gegeben.
- Der Reaktions-Mix sollte (Sonnen-)Licht möglichst nur kurz ausgesetzt werden und sofort wieder bei der richtigen Temperatur gelagert werden. Eine Blasenbildung sollte beim Pipettieren von Reaktions-Mix, Proben und Kontrollen vermieden werden.
- 4 μl der **Negativkontrolle** werden in die entsprechende Kavität gegeben und nach Möglichkeit einzeln verschlossen.
- 4 μl der **aufbereiteten DNA** werden in die entsprechenden Kavitäten gegeben und nach Möglichkeit einzeln verschlossen.
- Um das Risiko potentieller Kontaminationen zu verringern, werden als letztes, nachdem alle Proben und Kontrollreaktionen vorbereitet wurden, 4 μl der **Positivkontrolle** in die entsprechende Kavität gegeben. Vor jedem Gebrauch sollte die rehydrierte Positivkontrolle kurz gemischt und zentrifugiert werden (vgl. Kapitel 2. "Reagenzien und Materialien").
- Sofern noch nicht geschehen, werden alle Kavitäten verschlossen. In jedem Fall wird empfohlen, die Kavitäten vor dem PCR-Lauf zu zentrifugieren.

- Die Platte wird in den Real-Time PCR Cycler gestellt und die Amplifikation mit dem **Kylt® Profil II** wie unten angegeben gestartet.

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 FAM & HEX		

- Kylt® Profil II** ermöglicht die Kombination von Läufen dieser und der meisten anderen Kylt® qPCR Detektionsmethoden.
- Alternativ dazu kann das **Kylt® Profil II** auch mit einer verkürzten Amplifikationsdauer angewendet werden:

Kylt® Profil II kurz

Schritt	Beschreibung	Temperatur	Dauer	
1	Aktivierung Polymerase	95 °C	5 min	
2	Denaturierung	95 °C	10 sek	} 42 Zyklen
3	Annealing & Extension	60 °C	30 sek	
4	Fluoreszenzmessung	Kanäle FAM & HEX		

- Als weitere Alternative kann das unten angegebene **Kylt® Profil I** verwendet werden. Kylt® Profil I ermöglicht die Kombination von Läufen dieser und den meisten anderen Kylt® qPCR Detektionsmethoden sowie Kylt® RT-qPCR Detektionsprodukten, die eine Reverse Transkription zur Detektion viraler RNA beinhalten.

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	} 42 Zyklen
4	Annealing & Extension	60 °C	1 min	
5	Fluoreszenzmessung	Kanäle FAM & HEX		

- Das **Kylt® Profil I** lässt sich ebenfalls mit einer verkürzten Amplifikationsdauer anwenden:

Kylt® Profil I kurz

Schritt	Beschreibung	Temperatur	Dauer	
1	Reverse Transkription	50 °C	10 min	
2	Aktivierung Polymerase	95 °C	1 min	
3	Denaturierung	95 °C	10 sek	} 42 Zyklen
4	Annealing & Extension	60 °C	30 sek	
5	Fluoreszenzmessung	Kanäle FAM & HEX		

- Bei einem kombinierten Real-Time (RT-)PCR Lauf muss unbedingt sichergestellt werden, dass alle benötigten Kanäle detektiert werden.
- Bitte beachten Sie die Geräte-spezifischen Angaben des Herstellers zu Ihrem Real-Time PCR Thermocycler.

5.4. Auswertung – Validität und Qualitatives Ergebnis

ALLGEMEINES

- Die Daten der Amplifikationsreaktionen können automatisch mit der spezifischen Software des Real-Time PCR Thermocyclers verarbeitet werden. Alternativ kann auch manuell ein Threshold gesetzt werden, dabei ist Folgendes zu beachten: Der Threshold sollte die FAM-Kurve und die HEX-Kurve im Bereich des linearen Anstiegs schneiden (logarithmische Skalierung der y-Achse). Durch das Setzen des Threshold ergibt dessen Schnittpunkt mit der HEX- und der FAM-Kurve den entsprechenden sogenannten "Cycle Threshold" (Ct), der negativ mit der anfänglichen Konzentration der Zielgen-Kopien in der Real-Time PCR-Reaktion korreliert.
- Nur Kurvenverläufe mit einer typischen exponentiellen Amplifikation, d.h. die Kurve der Rohdaten zeigt zu Beginn eine flache Basislinie, gefolgt von einem deutlichen (exponentiellen) Anstieg der Fluoreszenz und gegebenenfalls dem Erreichen einer Plateau-Phase (bei logarithmischer Skalierung der y-Achse), sind als positiv zu bewerten.
- Für die Testauswertung wird zunächst die Validität des Laufes bestimmt. Danach wird die Validität der einzelnen Proben mit Hilfe der Internen Amplifikations-Kontrolle anhand des zugehörigen Kanals (HEX) bestimmt. Schlussendlich wird der Afrikanische Schweinepest Virus-spezifische Status jeder Probe analysiert (FAM).

TESTAUSWERTUNG – KONTROLLREAKTIONEN

- Der **Real-Time PCR Test** ist nur **valide**, wenn die Kurven der Kontrollreaktionen wie folgt ausgewertet werden können:

Kontrollreaktionen	Kanal	
	HEX	FAM
Negativkontrolle	negativ	negativ
Positivkontrolle	positiv	positiv

- Die HEX-Kurve der Negativkontrolle ist negativ (Ct > 35).
- Der FAM-Ct-Wert der Positivkontrolle sollte > 15 und ≤ 35 sein und der HEX-Ct-Wert ≤ 35.

TESTAUSWERTUNG – PROBEN

Ziel	Kanal	Signal		
Interne Kontrolle (β-Aktin)	HEX	positiv	positiv / negativ	negativ
Virus der Afrikanischen Schweinepest	FAM	negativ	positiv	negativ
Die Probe ist Afrikanische Schweinepest Virus		negativ	positiv	gehemmt

- Eine **Probe** ist **negativ für das Virus der Afrikanischen Schweinepest**, wenn ihre HEX-Kurve positiv (Ct ≤ 35), aber ihre FAM-Kurve negativ ist.
- Eine **Probe** ist **positiv für das Virus der Afrikanischen Schweinepest**, wenn ihre FAM-Kurve positiv ist (Ct ≤ 42), unabhängig von der HEX-Kurve.
- Eine **Probe** ist **gehemmt**, wenn weder ihre FAM-Kurve noch ihre HEX-Kurve positiv ist.
- Empfehlung:** Im Falle einer gehemmten Probe sollte der gesamte Vorbereitungsprozess der DNA vom Ausgangsmaterial mit anschließender Real-Time PCR wiederholt werden.
- Einfache und zuverlässige Dateneingabe zu den Proben, Start des Real-Time RT-PCR-Laufes sowie anschließende qualitative Proben-Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse kann mittels der Kylt® Software vorgenommen werden.

6. ÄHNLICHE UND ERGÄNZENDE PRODUKTE

Produktname	Artikelnr.	Inhalt	Beschreibung
Kylt® CSF RTU	31814 / 31815	100 / 25	Real-Time PCR Detektionskit zum Nachweis des Virus der klassischen Schweinepest.
Kylt® ASF/CSF RTU	31822 / 31823	100 / 25	Real-Time PCR Detektionskit zum separaten Nachweis des Virus der afrikanischen und der klassischen Schweinepest.
Kylt® RNA/DNA Purification	31315	50	Kombinierte Aufreinigung von RNA und DNA aus Veterinärproben.
Kylt® RNA/DNA Purification HTP	31826	4 x 96	Kombinierte, Magnetic-Beads-basierte Aufreinigung von RNA und DNA aus Veterinärproben. Für Automatisierung geeignet.
Kylt® Purifier	31436	1	Gerät zur automatisierten, auf magnetischen Beads basierenden Aufreinigung von RNA und / oder DNA für hohen und mittleren Durchsatz.
Kylt® Purifier 48	31748	1	Gerät zur automatisierten, auf magnetischen Beads basierenden Aufreinigung von RNA und / oder DNA für geringen bis mittleren Durchsatz.
Kylt® Purifier Spin Tips	31434	5	Platte mit 96 separaten Spin Tips zum Mischen im Kylt® Purifier. Eine Platte pro Lauf wird benötigt. Ausreichend für 480 Proben. Eine Platte pro Lauf wird benötigt.
Kylt® Purifier Plates	31435	20	Platten für die verschiedenen Reagenzien im Aufreinigungs-kit. 4-5 Platten pro Lauf werden benötigt. Ausreichend für 320 bis 480 Proben (je nach Gerät und Protokoll).

7. BESTELLINFORMATIONEN

Für schnellen und effizienten Service senden Sie Ihre Bestellung bitte an orders.kylt-de@san-group.com mit folgenden Informationen:

- Lieferadresse
- Rechnungsadresse
- Telefonkontakt des Bestellers
- Name und Telefonnummer des Endnutzers (wenn abweichend)
- Bestellnummer
- Produktbeschreibung
- Artikelnummer
- Menge und Größe der Produkte

Produktion: SAN Group Biotech Germany GmbH · Muehlenstrasse 13 · 49685 Hoeltinghausen · 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 ein eingetragenes Warenzeichen.

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.

© 2023 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.

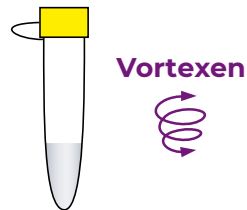




KURZANLEITUNG Real-Time PCR Setup

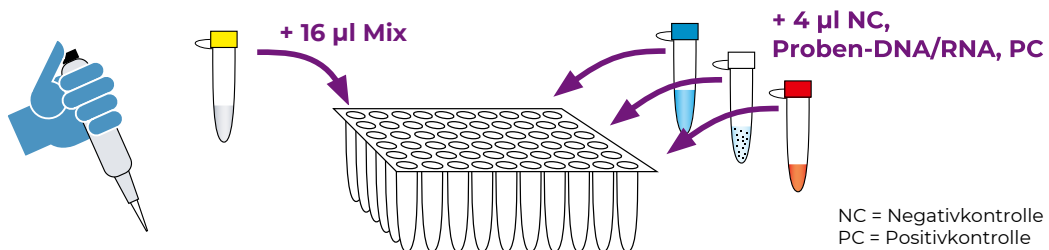
1

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

