

KYLT[®]

SAN[®]
VET



KYLT[®] IBDV GENOGROUP A3 (VERY VIRULENT)

REAL-TIME RT-PCR NACHWEIS

i Nur für die In-vitro-Veterinärdiagnostik.

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

Passion for Innovation



GEBRAUCHSANWEISUNG

RT-qPCR.IBDV.group.A3.02, Rev003, August 2024

KYLT[®] IBDV GENOGROUP A3 (VERY VIRULENT)

Real-Time RT-PCR Nachweis

1. ALLGEMEIN





Eigenschaft	Beschreibung
Artikelname	Kylt [®] IBDV genogroup A3 (very virulent) LD 100, Kylt [®] IBDV genogroup A3 (very virulent) LD 25
Name des Erregers	Genogruppe A3 des Virus der Infektiösen Bursitis des Huhnes
Erreger auch bekannt als	IBDV
Verursachte Krankheit	Gumboro-Krankheit, Infektiöse Bursitis
Organismus	Virus
Zielmolekül	RNA
Technologie	Real-Time RT-PCR
Interne Kontrolle	beta-actin (endogen)
Tierart	Geflügel (Huhn)
Vortestung mit	IBDV Screening
Probenarten	<ul style="list-style-type: none">■ IBDV-positive Proben, getestet mit z. B. Kylt IBDV Screening RT-qPCR FLI-C 100 (Art. 31477 / 31478)■ Gewebe und Organe (bspw. Bursa fabricii, Milz, lymphatisches Gewebe)■ Tupferproben■ Isolate aus kulturellen Verfahren
Ziel HEX-Kanal (550 nm)	beta-actin
Ziel FAM-Kanal (520 nm)	IBDV Genogruppe A3 (very virulent)
Poolen	Bis zu 5 Proben
Temperaturprofil	Kylt [®] Profil I

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

2. REAL-TIME PCR

Die RNA-Zielsequenzen werden zunächst revers transkribiert (Vorgang der Reversen Transkription (RT)) und anschließend parallel 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. 31601	25 Reaktionen Artikelnr. 31602	Lager- temperatur
2x RT-qPCR-Mix	 Transparent	4x 280 µl	1x 280 µl	<= -18°C
Detektions-Mix	 Violett	4x lyoph. final a 150 µl	1x lyoph. final a 150 µl	<= -18°C
Positivkontrolle	 Rot	4x lyoph. final a 50 µl	2x lyoph. final a 50 µl	<= -18°C
Negativkontrolle	 Blau	1x 1 ml	1x 1 ml	<= -18°C

4. LAGERBEDINGUNGEN

- Falls erforderlich, bereiten Sie Aliquots der Reagenzien vor, um die Einfrier-Auftau-Zyklen auf 3 zu begrenzen.
- Komponenten aus verschiedenen Chargen dürfen nicht miteinander vermischt oder ausgetauscht werden.
- Die Komponenten sind innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsdauer zu verwenden (siehe Verpackungsetikett).
- Der **Detektions-Mix** muss lichtgeschützt gelagert und verwendet werden.

5. REAGENZIVORBEREITUNG

- Vor dem ersten Gebrauch wird der **Detektions-Mix** rehydriert: je 150 µl der Negativkontrolle werden zu einem Lyophilisat gegeben, für kurze Zeit inkubiert und durch kurzes Puls-Vortexen gemischt.
- 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).
- Aufreinigungskit, das eine ausreichend hohe Konzentration an inhibitorfreier DNA/RNA liefert (z. B. Kylt RNA/DNA-Aufreinigungsprodukte).
- Kompatible PCR-Platten, Streifen oder einzelne Gefäße.
- Vortexer.
- Tisch-Mikrozentrifuge.
- 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 Kontrolle** basiert auf dem Nachweis von **beta-actin**, welche ubiquitär in den Zellen des Wirtes vorkommt aus dem die Probe stammt. Das beta-actin-Zielgen wird mit jeder einzelnen Reaktion ko-amplifiziert und ermöglicht die Evaluation der Probenahme und -lagerung, des Probenverkehrs, der Probenvorbereitung und der Real-Time RT-PCR selbst.
- Es wird empfohlen eine oder mehrere **RNA-Isolierungskontrollen (RIC)** pro RNA-Präparation durchzuführen. Die RIC ist eine "Scheinprobe", die aus dem normalen sterilen Puffer besteht, der für die Probenvorbereitung verwendet wird. Sie wird wie eine normale Probe verarbeitet und ermöglicht den Nachweis potenzieller Kontaminationen der verwendeten Reagenzien (zusätzlich zur Negativkontrollreaktion) sowie den Nachweis potenzieller Verschleppungskontaminationen zwischen einzelnen Proben, z. B. während der RNA-Aufbereitung.

8. REAKTIONS-SETUP

- **Hinweis:** Vor dem PCR-Setup muss die Probe denaturiert werden. Dies kann entweder für das gesamte Eluat oder nur für eine Teilmenge erfolgen. Zur Denaturierung muss die Probe 5 Minuten lang auf 95 °C erhitzt werden und sofort danach auf Eis abgekühlt werden.
- 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 RT-qPCR-Mix	10 µl	70 µl
Detektions-Mix	6 µl	42 µl
Gesamtvolumen Master-Mix	16 µl	112 µl (16 µl pro Reaktion vorlegen)
RNA (Negativkontrolle / Proben-RNA / RIC(s) / Positivkontrolle)	4µl	
Gesamtvolumen pro Reaktion	20 µl	

- Den 2x RT-qPCR-Mix, Detektions-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** (falls verwendet auch der **RIC**) 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 I gestartet.

- 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 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 Cyclus 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

- Nur IBDV-positive Proben können mit dem PCR Kit analysiert werden.
- Der Real-Time PCR-Lauf ist nur dann valide, wenn die Kurven der Kontrollreaktionen wie folgt ausgewertet werden können:
- Falls eine oder mehrere RNA-Isolationskontrollen (RIC) mitgeführt wurden, sollten die entsprechenden Kurven negativ sein.

Kontrollreaktionen	Kanal			
	HEX		FAM	
	Interne Kontrolle (beta-actin)		Pathogen-spezifischer Kanal	
Negativkontrolle	negativ	Ct > 35	negativ	Ct > 42
Positivkontrolle	positiv	Ct ≤ 35	positiv	Ct > 15 und ≤ 35

11. TESTAUSWERTUNG - PROBEN

Ziel	Kanal		Signal	
Interne Kontrolle (beta-actin)	HEX	positiv	positiv / negativ	negativ
<i>IBDV genogroup A3 (very virulent)</i>	FAM	negativ	positiv	negativ
Die Probe ist IBDV genogroup A3 (very virulent)		negativ	positiv	inhibiert

- Die **Interne Kontrolle (beta-actin)** ist positiv: Ct-Wert ≤ 35 .
- Der **Pathogen-spezifische Kanal** ist positiv: Ct-Wert ≤ 42 .
- **Empfehlung:** Im Falle einer inhibierten Probe kann der Test mit einer Verdünnung der RNA-Probe im Verhältnis von z. B. 1:4 wiederholt werden. Die Negativkontrolle dient hierbei als Verdünnungsmedium. Vorzugsweise wird die gesamte RNA-Präparation der Probe mit Kylt RNA/DNA-Purification Kits oder einer geeigneten Alternative 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.
- In Verbindung mit dem Impfschema der untersuchten Tiere, der vorhandenen Klinik und dem Nachweis des Impfstoffes TABic® MB (Phibro) können Rückschlüsse auf die Identität des in der Screening-PCR nachgewiesenen IBDV-Stammes gezogen 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
Rev002	January 2023	Anpassung der Fluoreszenzkanäle (C. Equipment and Reagents not included), neue Dokumentenr.
Rev003	August 2024	Neues Format/Design, Zusätzlicher Schritt in Kapitel „Reaktions-Setup“

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

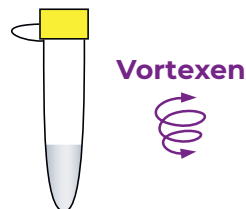
1

Bereiten Sie einen Master-Mix vor



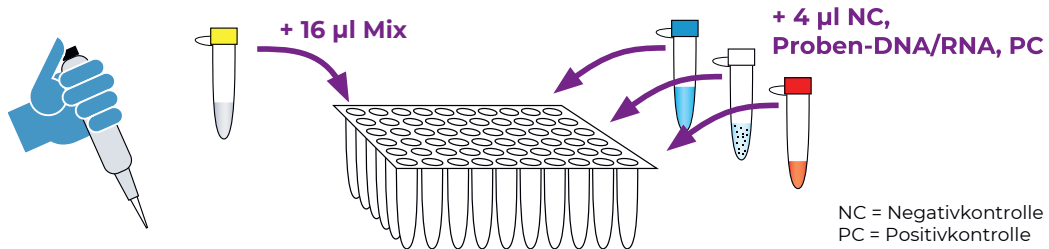
2

Vortexen und zentrifugieren



3

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



4

Versiegeln, zentrifugieren (empfohlen), Thermocycler starten



5

Analyse

