



Salmonella Genus DNA Detection Test Kit

vetproof® Salmonella qPCR LyoKit

Revision 6, Oktober 2024

Real-time PCR-Kit für den qualitativen Nachweis von *Salmonella* spp. in Proben aus der Primärproduktion von Hühnern.

▽ 96 Reaktionen

Produkt Nr. KIT230197 (V 900 27-1) / KIT230198 (V 900 27-2)

FLI-Zul.-Nr.: FLI-C 055. Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 11 Absatz 2 TierGesG zugelassen.
For the English instructions for use please contact diagnostics.support@hygiena.com or visit www.hygiena.com/support.

Lagerung bei 2 bis 8 °C

Nur für den tierärztlichen Gebrauch (für Huhn)
Nur für den *In-vitro*-Gebrauch



Inhaltsübersicht

1.	Produkt Beschreibung.....	3
1.1	Anzahl der Tests	3
1.2	Lagerung und Stabilität.....	3
1.3	Kitinhalt	3
1.4	Erklärung zur Anwendbarkeit	4
1.5	Zusätzlich benötigte Ausrüstung und Reagenzien.....	4
1.6	Vorbereitung der Proben.....	4
2.	Wie man dieses Produkt verwendet	4
2.1	Gute Laborpraxis für PCR.....	4
2.2	Verfahren.....	5
2.3	Interpretation der Daten	8
3.	Ergänzende Informationen	9
4.	Revisionsindex	11
5.	Informationen für Kunden	12

1. Produkt Beschreibung

Das Real-time PCR-Kit dient der qualitativen Detektion von *Salmonella* spp. in Kotproben und Umweltproben aus der Primärproduktion von Hühnern (z. B. Sockentupfer, Stäube, Wischproben, Gewebeproben). Das Kit enthält alle notwendigen Reagenzien und Kontrollen, die für den Nachweis von *Salmonella* benötigt werden. Primer und Sonden ermöglichen eine spezifische Erkennung von Salmonellen-DNA in Veterinärproben. Die interne Kontrolle (IC) verhindert Fehlinterpretationen von negativen Ergebnissen, welche durch eine Inhibition der PCR -Reaktion entstehen können. Die IC wird im VIC-Kanal detektiert, während die Salmonellen-DNA im FAM-Kanal detektiert wird. Bei Inhibition der PCR wird die Amplifikation der IC ebenfalls unterdrückt. Ein negatives Ergebnis im FAM-Kanal bei gleichzeitiger Amplifikation der IC zeigt, dass die Proben negativ für *Salmonella* sind.

Das **vetproof**[®] Salmonella qPCR LyoKit wurde in einem durch die Zertifizierungsorganisation MicroVal benannten Expertenlabor gemäß DIN EN ISO 16140-2:2016 validiert. Das Zertifikat (Nr. 2011LR42) ist unter www.microval.org oder unter www.hygiena.com einzusehen.

1.1 Anzahl der Tests

Der Kit ist für 96 Reaktionen mit einem Endvolumen von je 25 µl ausgelegt.

1.2 Lagerung und Stabilität

Lagerung des Kits bei 2 – 8 °C bis zum auf der Verpackung ausgezeichneten Verfallsdatum. Belassen Sie die Reaktionsgefäßstreifen mit dem lyophilisierten Reagenz im versiegelten Aluminiumbeutel und schützen Sie die Reagenzien vor Lichteinfall und Feuchtigkeit. Verschließen Sie nach dem Gebrauch den Beutel wieder sorgfältig.

1.3 Kitinhalt

	Komponente	Format	Funktion
1	PCR Plate, with 96 rxn (lyophilized reaction mix)	<ul style="list-style-type: none"> Aluminiumbeutel mit 96 Well- Plate mit 8er-Streifen PCR-Gefäßen KIT230197 (LP) mit „low profile“ 8er- Streifen PCR-Gefäßen * KIT230198 (RP) mit „regular profile“ 8er-Streifen PCR-Gefäßen * 	<ul style="list-style-type: none"> „Ready-to-use“ PCR-Reaktionsmix, welcher <i>Salmonella</i>-spezifische Primer und Sonden, eine interne Kontrolle, eine Taq-DNA-Polymerase und eine Uracil-DNA-Glycosylase (UNG, hitzeinstabil) enthält ** Für die Amplifikation und den Nachweis von <i>Salmonella-spezifischen</i> Sequenzen Vor Licht und Feuchtigkeit schützen 25 µl pro Reaktion.
2	Control Template	<ul style="list-style-type: none"> Gefäß 1 (lila Deckel) 	<ul style="list-style-type: none"> 1 x 900 µl Enthält eine stabilisierte Lösung von DNA Zur Verwendung als Positivkontrolle für den PCR-Lauf
3	H ₂ O PCR-grade	<ul style="list-style-type: none"> Gefäß 2 (farbloser Deckel) 	<ul style="list-style-type: none"> 2 x 1 ml nukleasefrei, „PCR-grade“ H₂O. Negativkontrolle für den PCR-Lauf
4	Cap Strips	<ul style="list-style-type: none"> Plastikbeutel mit 8er Deckelstreifen 	<ul style="list-style-type: none"> 12 x 8er-Deckelstreifen Zum Verschließen der 8er-Streifen nach Zugabe der Proben.

* Die Kompatibilität der PCR-Gefäße mit Real-time PCR-Instrumenten wird von Hygiena Diagnostics GmbH bereitgestellt: <http://www.hygiena.com>

** Der PCR-Reaktionsmix enthält Taq-Polymerase für die PCR und Uracil-DNA-Glycosylase für einen effizienten Abbau von zuvor amplifizierter DNA. Das Real-time PCR-Kit enthält anstelle von dTTP dUTP, welches während der Amplifikation eingebaut wird. Das produzierte PCR-Produkt enthält in beiden Strängen Uracilreste und unterscheidet sich auf diese Weise von jeder zu amplifizierenden Ausgangs-DNA. Nach dem Verdau mit UNG wird zuvor amplifizierte DNA in Bruchstücke gespalten und somit ein Kontaminationsrisiko vermindert.

1.4 Erklärung zur Anwendbarkeit

Dieses Kit ist mit allen real-time PCR-Geräten kompatibel, die für den Nachweis von FAM- und VIC-Fluorophoren geeignet sind.

1.5 Zusätzlich benötigte Ausrüstung und Reagenzien

- Real-time PCR-Cycler, geeignet für den Nachweis von FAM- und VIC-markierten Sonden
- DNA-Extraktionsverfahren (siehe: *Vorbereitung der Proben > DNA-Extraktion*)
- Zentrifuge für 8-strip PCR-Gefäße (150 x g)
- Pipetten
- Nuklease-freie Filterspitzen
- Puderfreie Einweghandschuhe
- Schere

1.6 Vorbereitung der Proben

Anreicherung der Proben

Relevantes Probenmaterial (z. B. Sockentupfer, Staub- oder Kotproben) wird in dem wie in der ISO 6579 vorgegebenen Volumenverhältnis in gepuffertem Peptonwasser (BPW) für 18 ± 2 Stunden bei 37 ± 1 °C angereichert. Die Anreicherung in Beuteln von Stomacher® mit Filtern wird empfohlen.

Für Kotproben sowie Probenmaterial mit einem hohen Anteil an Erde wird eine zweite Anreicherung empfohlen. Hierzu wird nach der Anreicherung in BPW die Probe in einem Volumenverhältnis von 1:10 in vorgewärmter MOSSEL-Bouillon (z. B. 1 ml Voranreicherung + 9 ml MOSSEL) überführt und für mindestens 5 h +/- 0.5 h bei 37 ± 1 °C und 150 rpm inkubiert.

DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wird das **foodproof**® StarPrep Three Kit (Produkt Nr. KIT230187) oder das **foodproof**® StarPrep One Kit (Produkt Nr. KIT230175, oder KIT230176 für die Verwendung mit 8-Kanal-Pipetten) empfohlen. Für den gleichzeitigen Nachweis und die Differenzierung von Impfstämmen (**vetproof**® SE Vaccine qPCR LyoKit Produktnr. KIT230193/KIT230194) aus einer Extraktion sollte das **foodproof**® StarPrep Three Kit verwendet werden.

2. Wie man dieses Produkt verwendet

2.1 Gute Laborpraxis für PCR

- Die Tests dürfen nur von qualifiziertem Laborpersonal durchgeführt werden.
- Tragen Sie in jeder Phase der Testdurchführung und/oder Probenvorbereitung puderfreie Einweghandschuhe. Wechseln Sie die Handschuhe, wenn Sie den Arbeitsbereich wechseln oder wenn Sie vermuten, dass sie kontaminiert sind.
- Behandeln Sie alle biologischen Materialien als potenziell biologisch gefährlich, einschließlich aller Feldproben.
- Vermeiden Sie es, die gefriergetrocknete Reaktionsmischung über einen längeren Zeitraum direktem Licht und Feuchtigkeit auszusetzen.
- Verwenden Sie nukleasefreie Laborgeräte (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße).
- Um eine Kreuzkontamination von Proben und Reagenzien zu vermeiden, sollten Sie Pipettenspitzen mit Aerosolschutz verwenden.
- Die strikte Einhaltung des Testprotokolls führt zu den besten Ergebnissen.
- Trennen Sie die Arbeitsplätze für die DNA/RNA-Extraktion, das PCR-Setup (Arbeitsbereich 2) und die PCR-Amplifikation (Arbeitsbereich 3), räumlich voneinander, um das Risiko einer Kontaminationsverschleppung zu minimieren.
- Verwenden Sie für alle Pipettierschritte eine PCR-Haube. Da der Kit als gebrauchsfertige lyophilisierte Mischung geliefert wird, ist ein spezieller Arbeitsbereich für das Reagenzien-Setup (Arbeitsbereich 1) nicht erforderlich.

- Bewegen Sie niemals Materialien von Arbeitsbereich 3 nach Arbeitsbereich 2 oder von Arbeitsbereich 2 und 3 nach Arbeitsbereich 1.
- Dekontaminieren Sie PCR-Labors mit Bleichmittel oder einem alternativen DNA-Dekontaminationsmittel und UV-Licht (optional) nach den Tests.

2.2 Verfahren

Real-Time-PCR Zeit-Temperatur-Protokoll

Das folgende Protokoll ist optimiert für ein Real-Time PCR-Gerät mit einem FAM- (für *Salmonella*) und einem VIC- (interne Kontrolle) Detektionskanal.

Die Programmierung des Zeit-Temperatur-Protokolls sollte vor der Probenvorbereitung erfolgen. Folgendes Real-Time PCR-Protokoll wird für das **vetproof®** Salmonella qPCR LyoKit eingesetzt (die Programmierung des jeweiligen Real-Time PCR-Gerätes bitte der entsprechenden Gebrauchsanweisung entnehmen).

Vorinkubation **1** Zyklus

Schritt 1: 37 °C für 4 Minuten
 Schritt 2: 95 °C für 5 Minuten

Amplifikation **50** Zyklen

Schritt 1: 95 °C für 5 Sekunden
 Schritt 2*: 60 °C für 60 Sekunden

* Fluoreszenznachweis in Schritt 2

Anmerkung:

- Für Real-Time-PCR-Geräte ohne VIC-Detektionskanal kann HEX verwendet werden.
- Bei einigen Real-Time PCR-Geräten muss der Typ des Sonden-Quenchers sowie die Verwendung eines passiven Referenzfarbstoffes spezifiziert werden. Das **vetproof®** Salmonella qPCR LyoKit enthält Sonden mit einem nicht-fluoreszierenden ("dunklen") Quencher und keinen passiven Referenzfarbstoff.

Vorbereitung der PCR-Mischung

Gehen Sie wie unten beschrieben vor, um eine 25 µl Standardreaktion vorzubereiten.

Tragen Sie bei der Handhabung der PCR-Gefäße stets Handschuhe. Das Probenmaterial sollte hinsichtlich Reinheit, Konzentration und Vorhandensein von Hemmstoffen für die PCR geeignet sein.

Hinweis: Die gefriergetrocknete Reaktionsmischung ist nur dann stabil, wenn die PCR-Streifen in dem mitgelieferten Aluminiumbeutel mit den Kieselgel-Pads aufbewahrt werden, um eine Flüssigkeitsaufnahme zu vermeiden.

1. Nehmen Sie die benötigte Anzahl an Reaktionen aus dem Aluminiumbeutel. Nutzen Sie zum Zerschneiden der Streifen eine Schere. Verschließen Sie anschließend den Beutel wieder.
2. Stellen Sie die PCR-Streifen mit dem lyophilisierten Reagenz in ein dafür passendes PCR-Rack. Überprüfen Sie, ob sich das Reagenzpellet auf dem Boden des Gefäßes befindet. Sollte dies nicht der Fall sein, zentrifugieren oder schnippen Sie kurz das Pellet runter, bevor Sie fortfahren.
3. Öffnen Sie die PCR-Streifen vorsichtig und werfen Sie die Deckelstreifen. **Hinweis:** Die Streifen dürfen nicht längere Zeit offen stehen. Um ungewollte Flüssigkeitsabsorption durch das lyophilisierte Reagenz zu vermeiden, öffnen Sie die Streifen erst kurz vor dem Befüllen.



4. Füllen Sie jeweils 25 µl der extrahierten Proben-DNA in ein Reaktionsgefäß. Das Pellet muss vollständig durch vorsichtiges hoch- und runterpipettieren resuspendiert werden.
 - Von jeder Probe werden 25 µl zum lyophilisierten Reagenz gegeben. Wenn weniger Volumen genutzt wird, muss das Volumen auf 25 µl mit PCR-grade H₂O aufgefüllt werden.
 - Für die Negativkontrolle werden 25 µl PCR-grade H₂O (farbloser Deckel) zum Reagenz gegeben.
 - Für die Positivkontrolle werden 25 µl vom Control Template (lila Deckel) zum Reagenz gegeben.
5. Schließen Sie die Gefäße mit den neuen, mitgelieferten farblosen Deckelstreifen.

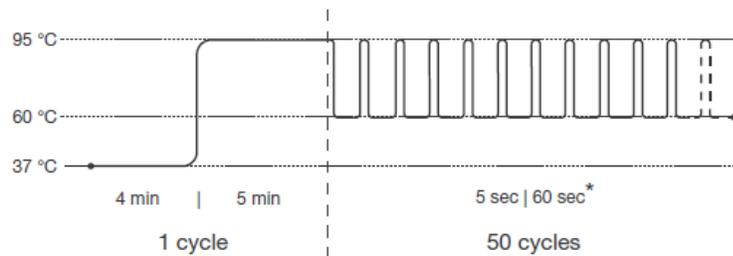
Hinweise: Alternativ kann das Pellet nach dem Verschließen der Gefäße durch gründliches Schütteln resuspendiert werden. Um das Kreuzkontaminationsrisiko zu vermindern, sollte jeweils nur ein PCR-Streifen bearbeitet werden.

Bei der Verwendung der RP PCR-Gefäße sollte bei dem Lösen der Pellets durch Schütteln auf die Dichtheit der Deckelstreifen geachtet werden.
6. Zentrifugieren Sie die PCR-Streifen kurz (5 Sekunden) in einer entsprechenden Zentrifuge bei ca. 150 x g.
7. Stellen Sie die Proben in den PCR-Cycler starten Sie das Programm wie oben beschrieben.

Hinweis: Für einige PCR-Geräte ist es wichtig, die Proben gleichmäßig im Block des Cyclers zu verteilen. Zum Beispiel können zwei Streifen auf die Spalten 1 und 12 positioniert werden.

Arbeitsablauf-Diagramm für die Real-Time PCR

Programm einrichten: Richten Sie das PCR-Gerät ein, bevor Sie die Proben vorbereiten. Weisen Sie diese Kanäle zu: FAM (Salmonellen) und VIC (Interne Kontrolle)



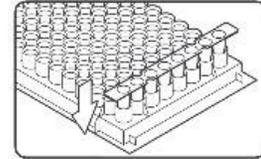
Vorinkubation: 1 Zyklus
Schritt 1: 37 °C für 4 Minuten
Schritt 2: 95 °C für 5 Minuten
Amplifikation: 50 Zyklen
Schritt 1: 95 °C für 5 Sekunden
Schritt 2*: 60 °C für 60 Sekunden
* Messung in Schritt 2

Durchführung: Real-Time-PCR

Treffen Sie geeignete Vorsichtsmaßnahmen, um eine Kontamination zu vermeiden, z. B. durch Verwendung von Filterspitzen und Tragen von Handschuhen.

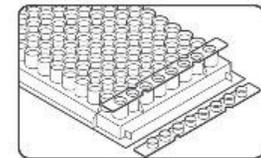
1. STREIFEN IN GESTELL LEGEN

Nehmen Sie die benötigte Anzahl von PCR-Gefäßen aus dem Aluminiumbeutel. Wichtig: Verschließen Sie den Beutel anschließend wieder fest. Legen Sie die Streifen in ein geeignetes PCR-Gefäßgestell. Falls erforderlich, die Gefäße vorsichtig schütteln, um die gefriergetrockneten Pellets auf den Boden aller Gefäße zu bringen.



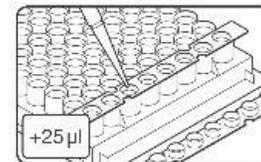
2. ÖFFNEN DER PCR-STREIFEN

Die Streifen kurz vor dem Befüllen vorsichtig öffnen und die Deckel wegwerfen. Nicht länger als nötig offen lassen.



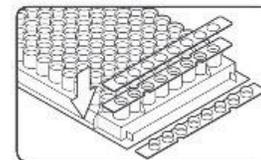
3. PROBEN UND KONTROLLEN HINZUFÜGEN

Pipettieren Sie 25 µl der Proben, der Negativkontrolle (durchsichtige Kappen) oder der Control Template (lila Kappe) in die jeweiligen Vertiefungen. Bei Verwendung eines geringeren Probenvolumens fügen Sie PCR-grade H₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl hinzu.



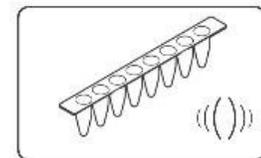
4. VERSCHLIESSEN DER PCR-STREIFEN

Verschließen Sie die Röhrchen mit den 8er-Streifen sorgfältig.



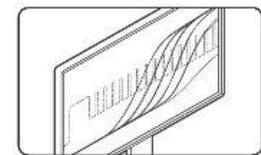
5. MISCHEN UND ZENTRIFUGIEREN

Das Pellet muss vollständig mit der Proben-Flüssigkeit gelöst werden. Hierfür kann das Pellet vor dem Verschließen durch vorsichtiges Hoch- und Runterpipettieren resuspendiert werden. Alternativ kann das Pellet nach dem Verschließen der Gefäße durch gründliches Schütteln resuspendiert werden. Zentrifugieren Sie die PCR-Streifen kurz (5 Sekunden) in einer entsprechenden Zentrifuge bei ca. 150 x g.



6. REAL-TIME-PCR-LAUF STARTEN

Proben wie oben beschrieben zyklisieren. Die Streifen gleichmäßig im Cycler - Block verteilen (z. B. können zwei Streifen in Spalte 1 und 12 platziert werden).



2.3 Interpretation der Daten

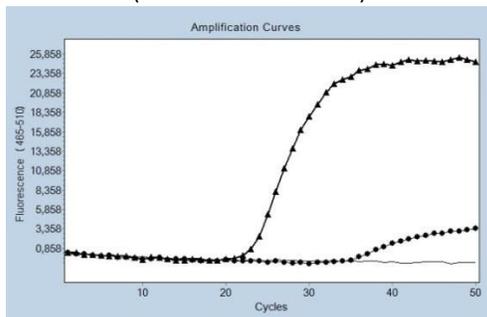
Die Amplifizierung der *Salmonella*-DNA wird im FAM-Detektionskanal analysiert und die interne Amplifikationskontrolle im VIC-Detektionskanal. Um PCR-Inhibition auszuschließen, muss bei einem negativen Ergebnis im FAM-Kanal die Amplifikation im VIC-Detektionskanal überprüft werden.

Auswertung der Ergebnisse

Kanal FAM	Kanal VIC	Ergebnisse
Positiv (Cq-Wert: 10 - 50)	Positiv oder negativ	Positiv für <i>Salmonella</i> spp.
Negativ	Positiv (Cq-Wert: 25 - 40)	Negativ für <i>Salmonella</i> spp.
Negativ	Negativ	Ungültig

Abbildung 1

FAM-Kanal (*Salmonella*-Detektion)

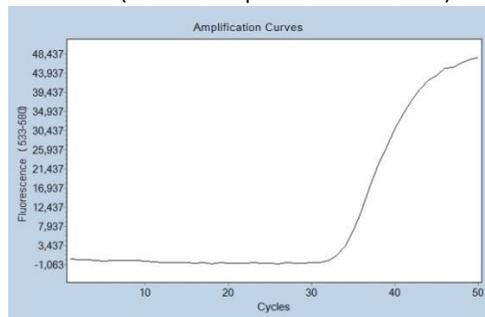


Legende:

- Dreieck: hohe Konzentration von *Salmonella*-DNA
- Kreis: geringe Konzentration von *Salmonella*-DNA
- Linie: Probe ohne *Salmonella*-DNA

Abbildung 2

VIC-Kanal (interne Amplifikationskontrolle)



Positives Ergebnis: Anwesenheit von *Salmonella* spp. (Feldstamm oder Impfstamm) in der Probe. Ein positives Ergebnis erfordert weitere mikrobiologische Untersuchungen zum Nachweis, zur Typisierung und Differenzierung von *Salmonella*-Feld und *Salmonella* Impfstämmen.

Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für eine Amplifikationskurve für Proben mit hohen und niedrigen Konzentrationen von *Salmonella*-DNA. Ebenfalls dargestellt ist die Kurve einer Probe, die keine *Salmonella*-DNA enthält. Für diese Probe ergibt nur die interne Kontrolle eine positive Signalkurve (Abbildung 2), was ein wirklich negatives Ergebnis für *Salmonella* spp. darstellt.

Hinweis: Eine geeignete Kalibrierung der FAM- und VIC-Kanäle in Ihrem Real-Time-PCR-Gerät ist für die Unterscheidung von *Salmonellen* und der internen Kontrolle erforderlich. Befolgen Sie die Anweisungen für Ihren Real-Time PCR-Cycler.

3. Ergänzende Informationen

Symbole Glossar

REF	Produkt-Nummer		Verwendbar bis:
	Kitgröße/Reaktionszahl		Vor Feuchtigkeit schützen
	Lagern bei		Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen
	Chargen Bezeichnung		Hersteller

Qualitätskontrolle

Alle Produkte werden von unserer Qualitätskontrolle von Charge zu Charge überwacht. Ein Analysezertifikat (CoA) ist bei Hygiena Diagnostics GmbH unter www.hygiena.com erhältlich.

Informationen zur Bestellung

Dieses Kit und die dazugehörigen Produkte sind bei Hygiena Diagnostics GmbH erhältlich. Für eine vollständige Übersicht und weitere Informationen besuchen Sie bitte unsere Website unter www.hygiena.com.

Markenzeichen

vetproof[®] und **foodproof**[®] sind Marken der Hygiena Diagnostics GmbH.



Garantie und Haftungsausschluss

"Eingeschränkte Garantie" und "Haftungsausschluss": Hygiena Diagnostics GmbH garantiert, dass dieses Produkt bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum frei von Material- und Verarbeitungsfehlern ist, und zwar nur, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

1. Das Produkt wird gemäß den in der Produktliteratur angegebenen Richtlinien und Anweisungen verwendet;
2. Die Hygiena Diagnostics GmbH übernimmt keine Garantie für ihr Produkt, wenn: der Defekt eine Folge von Material oder Verarbeitung ist, die nicht von der Hygiena Diagnostics GmbH geliefert wurde; Defekte, die durch unsachgemäßen Gebrauch oder Gebrauch entgegen der mitgelieferten Anweisungen verursacht wurden, oder unsachgemäße Lagerung oder Handhabung des Produkts;
3. Alle schriftlichen, mündlichen, ausdrücklichen oder stillschweigenden Garantien der Marktgängigkeit und Eignung für einen bestimmten Zweck gelten nur für einen Zeitraum von einem Jahr ab dem Herstellungsdatum. Es gibt keine weiteren Garantien, die über die auf der Vorderseite dieser Garantie beschriebenen hinausgehen;
4. Hygiena Diagnostics GmbH übernimmt gegenüber dem Käufer ihrer Produkte keine Verantwortung für irgendwelche Verpflichtungen, Zusicherungen oder Garantien, die von Händlern oder Verteilern, die ihre Produkte verkaufen, abgegeben werden, es sei denn, sie werden von einem leitenden Angestellten von Hygiena Diagnostics GmbH schriftlich bestätigt;
5. Hygiena Diagnostics GmbH übernimmt keine Verantwortung für beiläufig entstandene Schäden oder Folgeschäden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Verantwortung für den Verlust der Nutzung dieses Produkts, Entfernung oder Ersatzarbeit, Zeitverlust, Unannehmlichkeiten, Kosten für Telefongespräche, Versandkosten, Verlust oder Beschädigung von Eigentum oder Einkommensverluste, Personenschäden oder widerrechtliche Tötung;
6. Hygiena Diagnostics GmbH behält sich das Recht vor, Module, die im Rahmen dieser Garantie zurückgegeben werden, zu ersetzen oder eine Gutschrift zu gewähren.

Regulatorische Haftungsausschlüsse

Nur für den tierärztlichen Gebrauch (für Huhn). Nur für den In-vitro-Gebrauch.

Die gesetzlichen Bestimmungen variieren von Land zu Land; dieses Produkt ist möglicherweise in Ihrer Region nicht erhältlich. Für Informationen zur Verfügbarkeit wenden Sie sich bitte an Hygiena Diagnostics GmbH.



4. Revisionsindex

Version 1: Version vor der Markteinführung

Version 2: Endgültige Fassung nach Konsultationen mit der deutschen Zulassungsstelle

Version 3: Hinweis zur Validierung nach DIN EN 16140-2:2016 hinzugefügt

Version 4: Geänderter Kit-Name, Produktcode, Layout, Produkthanweisungen und Lieferanteninformationen

Version 5: Endgültige Fassung nach Konsultationen mit der deutschen Zulassungsstelle

Version 6: Umwandlung in Hygiena Layout, da Hygiena Diagnostics GmbH der Lizenzinhaber und Hersteller des Kits ist, Anpassung der Kitbezeichnungen im Text an den neuen Namen, redaktionelle Anpassungen, Ct gegen Cq getauscht.

5. Informationen für Kunden



Hygiena Diagnostics GmbH
Hermannswerder 17
14473 Potsdam - Deutschland