


**vetproof® Salmonella Detection Kit**  
**- 5'Nuclease -**

**Artikel-Nr. V 900 27**

**Gebrauchsinformation**

**Version 3, Februar 2020 – DE**

Nur für veterinärmedizinische Diagnostik (für Huhn)

FLI-Zul.-Nr.: FLI-C-055. Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 11 Absatz 2 TierGesG zugelassen  96 Rkt.  
For the english instructions for use please contact [bcd@bc-diagnostics.com](mailto:bcd@bc-diagnostics.com)

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 Detection Kit** 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](http://www.microval.org) oder unter [www.bc-diagnostics.com](http://www.bc-diagnostics.com) einzusehen.

**A. Kitinhalt**

Komponente	Art und Form	Funktion
PCR Plate, with 96 rxn (lyophilized reaction mix) <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;">1</div>	Aluminiumbeutel mit 96 Well-Platte mit 8er-Streifen PCR-Gefäßen • V 900 27-1 (LP) mit „low profile“ 8er-Streifen PCR-Gefäßen * • V 900 27-2 (RP) mit „regular profile“ 8er-Streifen PCR-Gefäßen *	<ul style="list-style-type: none"> <li>• „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 **.</li> <li>• Für die Amplifikation und den Nachweis von <i>Salmonella</i>-spezifischen Sequenzen.</li> <li>• Vor Licht und Feuchtigkeit schützen.</li> <li>• 25 µl pro Reaktion.</li> </ul>
Control Template <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;">2</div>	Gefäß 1 (lila Deckel)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 x 900 µl</li> <li>• Enthält eine Lösung stabilisierter DNA.</li> <li>• Positivkontrolle für den PCR-Lauf.</li> </ul>
H <sub>2</sub> O PCR-grade <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;">3</div>	Gefäß 2 (farbloser Deckel)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 x 1 ml</li> <li>• nukleasefrei, „PCR-grade“ H<sub>2</sub>O.</li> <li>• Negativkontrolle für den PCR-Lauf.</li> </ul>
Cap Strips <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;">4</div>	Plastikbeutel mit 8er Deckelstreifen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 12 x 8er-Deckelstreifen</li> <li>• Zum Verschließen der 8er-Streifen nach Zugabe der Proben.</li> </ul>

\* Kompatibilität der PCR-Gefäße mit Real-time PCR Instrumenten stellt BIOTECON Diagnostics online zur Verfügung: [www.bc-diagnostics.com/compatibility-chart](http://www.bc-diagnostics.com/compatibility-chart)

\*\*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.

**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.**

**Zusätzlich erforderliches Equipment**

- Real-time PCR-Cycler geeignet für die Detektion von FAM- und VIC- Signalen
- Nuclease-freie Pipettenspitzen
- Pipetten
- Zentrifuge für 8er-Streifen PCR-Gefäße (150 x g).

**B. Probenvorbereitung**

**Anreicherung der Proben**

Relevantes Probenmaterial wie Sockentupfer, Staub oder Kotproben werden in dem wie in der ISO 6579 vorgegeben Volumenverhältnis in gepuffertem Peptonwasser („Buffered Peptone Water“, BPW) für 18 +/- 2 h bei 37 +/-1°C angereichert. Eine Anreicherung in Stomacher®-Beuteln mit Filtern ist vorteilhaft.

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**

Zur DNA-Extraktion wird das **foodproof®** StarPrep Three Kit (Bestellnummer S 400 18)<sup>1</sup> oder das **foodproof®** StarPrep One Kit (Bestellnummer S 400 07, oder S 400 14 L für die Verwendung mit 8-Kanal-Pipette)<sup>1</sup> empfohlen. Bei einer gleichzeitigen Untersuchung auf Lebendvakzine sollte ausschließlich das **foodproof®** StarPrep Three Kit verwendet werden.

<sup>1</sup> Erhältlich von BIOTECON Diagnostics; für weitere Details siehe Bestellinformationen

### C. 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* Detection Kit** eingesetzt (die Programmierung des jeweilige Real-Time PCR-Gerätes bitte der entsprechende Gebrauchsanweisung entnehmen).

<u>Vorinkubation</u>	1 Zyklus
Schritt 1:	37 °C für 4 Minuten
Schritt 2:	95 °C für 5 Minuten
<u>Amplifikation</u>	50 Zyklen
Schritt 1:	95 °C für 5 Sekunden
Schritt 2*:	60 °C für 60 Sekunden
* Fluoreszenzmessung in Schritt 2	

#### Hinweis:

- Für PCR-Geräte ohne VIC-Detektionskanal kann der HEX-Detektionskanal genutzt werden. Für den PikoReal® muss Yakima Yellow(YY) genutzt werden.
- Für einige Real-time PCR-Geräte muss die Art des Sondenquenchers und die Nutzung des passiven Referenzfarbstoffs spezifiziert werden. Das **vetproof® *Salmonella* Detection Kit** beinhaltet Sonden mit einem nicht fluoreszierenden ("dark") Quencher und enthält keine passiven Referenzfarbstoffe.

### D. Real-time PCR Durchführung

Gehen Sie wie folgt vor, um eine 25 µl Standard Reaktion anzusetzen.

Tragen Sie beim Umgang mit den PCR-Reaktionsgefäßen immer Handschuhe!

Das Probenmaterial sollte für eine PCR hinsichtlich der Reinheit, der Konzentration und der Abwesenheit von Inhibitoren geeignet sein (siehe Kapitel B).

**Hinweis:** Die PCR-Streifen müssen in der bereitgestellten Aluminiumverpackung zusammen mit den Trockenmittelbeutel gelagert werden, um die Absorption von Feuchtigkeit durch das Reagenz 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 schnipsen 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 H<sub>2</sub>O aufgefüllt werden.
  - Für die Negativkontrolle werden 25 µl PCR-grade H<sub>2</sub>O (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-Cyclern, 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.

### E. 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.

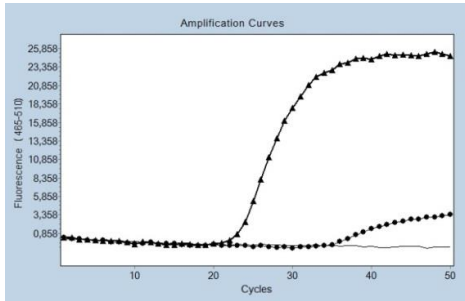
Die möglichen Ergebnisse in den beiden Detektionskanälen und ihre Interpretation sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Kanal FAM	Kanal VIC	Ergebnis Interpretation
Positiv (Ct-Wert 10 – 50)	Positiv oder Negativ	Positiv für <i>Salmonella</i> spp.
Negativ	Positiv (Ct-Wert 25 – 40)	Negativ für <i>Salmonella</i> spp.
Negativ	Negativ	Ungültig

Die Abbildung 1 zeigt beispielhaft die Amplifikationskurven von Proben mit einer hohen und einer geringen Menge an *Salmonella*-DNA. Dargestellt ist auch die Kurve einer Probe ohne *Salmonella*-DNA. Diese Probe weist nur eine positive Fluoreszenzkurve für die interne Amplifikationskontrolle im Detektionskanal VIC auf, dargestellt in Abbildung 2, und stellt somit ein valides negatives Ergebnis für *Salmonella* spp. dar.

**Abbildung 1**

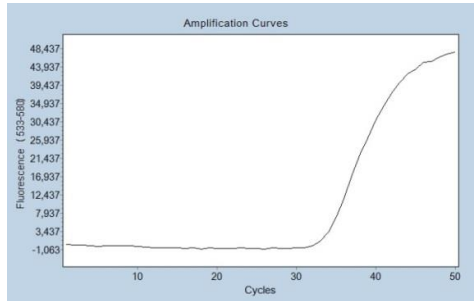
FAM-Kanal (*Salmonella*-Detektion)



Dreiecke: hohe Konzentration an *Salmonella*-DNA  
 Kreise: niedrige Konzentration an *Salmonella*-DNA  
 Linie: Probe ohne *Salmonella*-DNA

**Abbildung 2**

VIC-Kanal (interne Amplifikationskontrolle)



**Hinweis:** Voraussetzung für die eindeutige Diskriminierung von *Salmonella* und der internen Kontrolle ist eine geeignete Kalibrierung des Real-time PCR-Gerätes für die Kanäle FAM und VIC. Bitte beachten Sie die Bedienungsanleitung Ihres Real-Time PCR-Cyclers für weitere Informationen.

**Positives Ergebnis:** Anwesenheit von *Salmonella* spp. (Feldstamm oder Impfstamm), d.h. es sind potentiell vermehrungsfähige meldepflichtige Salmonellen enthalten. Ein positives Ergebnis erfordert weitere mikrobiologische Untersuchungen zur Typisierung und Differenzierung von *Salmonella*-Feld- und *Salmonella*-Impfstämmen.

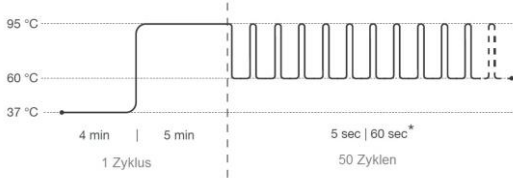


## F. Arbeitsablauf-Diagramm für die Real-Time PCR

### Zeit-Temperatur-Protokoll

Programmieren Sie Ihr PCR-Gerät, bevor Sie die PCR-Reaktionen ansetzen. Wählen Sie die folgende Kanäle:

- FAM (für *Salmonella*) und VIC (für die 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

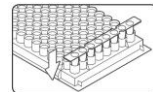
\* Fluoreszenzmessung in Schritt 2

### Real-time PCR-Durchführung

Achten Sie darauf kontaminationsfrei zu arbeiten: Verwenden Sie z. B. Filterspitzen und Handschuhe.

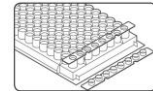
#### 1. PCR-STREIFEN IM RACK PLATZIEREN

Nehmen Sie die benötigte Anzahl an PCR-Streifen aus dem Aluminiumbeutel. Wichtig: Schließen Sie den Beutel danach wieder fest zu. Platzieren Sie den PCR-Streifen in einem PCR-Rack.



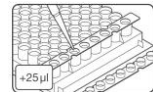
#### 2. ÖFFNEN DER PCR-STREIFEN

Öffnen Sie die PCR-Streifen vorsichtig direkt vor dem Befüllen und werfen Sie die Deckel in den Abfall. Halten Sie die PCR-Streifen nicht länger als nötig offen.



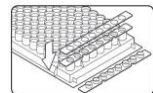
#### 3. ZUGABE VON PROBEN UND KONTROLLEN

Pipettieren Sie jeweils 25 µl pro Probe, Negativkontrolle (farbloser Deckel) und Control Template (lila Deckel) in einzelne Gefäße (Wells). Wenn Sie von einer Probe weniger als 25 µl verwenden, füllen Sie mit PCR-grade H<sub>2</sub>O (farbloser Deckel) auf so dass in Summe 25 µl verwendet werden.



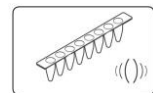
#### 4. VERSCHLIESSEN DER PCR-STREIFEN

Nutzen Sie die mitgelieferten neuen Deckel zum Verschließen der PCR-Streifen.



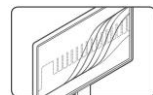
#### 5. MISCHEN UND ZENTRIFUGIEREN

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. START DES REAL-TIME PCR-LAUFS

Den PCR-Lauf mit dem oben beschriebenen Protokoll starten. Platzieren Sie die PCR-Streifen ausbalanciert im Gerät, z. B. können zwei Streifen in Spalte 1 und 12 platziert werden.



## G. Troubleshooting

Beobachtung	Mögliche Gründe	Maßnahmen
Kein Kurvenanstieg kann beobachtet werden, auch bei der Positivkontrolle nicht.	Falscher Detektionskanal wurde ausgewählt.	Stellen Sie „channel settings“ von FAM und VIC/HEX ein.
	Fehlerhaftes Pipettieren.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Überprüfung des korrekten Reaktionssetups. Wiederholen der PCR.</li> <li>Es sollte immer eine Positivkontrolle mitgeführt werden.</li> </ul>
	Keine Datenaufzeichnung abgespeichert.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Überprüfung des Cycler-Programms.</li> </ul>
Kein Kurvenanstieg im VIC/HEX-Kanal.	Inhibitorische Effekte der Probenmatrix (z. B. verursacht durch eine unzureichende Aufreinigung).	<ul style="list-style-type: none"> <li>Probenverdünnung oder Einsatz von einer kleineren Probenmenge (z. B. 5 µl Proben Volumen und 20 µl H<sub>2</sub>O anstelle von 25 µl).</li> </ul>
Die Fluoreszenzintensität ist zu gering.	Unkorrekte Lagerung des Kits.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lagerung des lyophilisierten PCR-Mixes bei 2 °C bis 8 °C, geschützt vor Licht und Feuchtigkeit.</li> </ul>
	Geringe Mengen an Target-DNA.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Erhöhung der Proben-DNA-Menge. Abhängig von der gewählten DNA-Isolationsmethode können inhibitorische Effekte in der PCR auftreten.</li> </ul>
Starke Reduktion der Fluoreszenz-Baseline.	Keine vollständige Resuspendierung des Pellets.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Immer den lyophilisierten PCR-Mix sorgfältig resuspendieren.</li> </ul>
Negativkontrollen sind positiv.	Kreuzkontamination.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Austausch aller kritischen Lösungen.</li> <li>Wiederholung des gesamten Experiments mit neuen Aliquots aller Reagenzien.</li> <li>Behandlung der Proben, Kitkomponenten und Verbrauchsmaterialien im Rahmen der allgemein akzeptierten Praxis um Verschleppungskontaminationen zu vermeiden.</li> <li>Zugabe der Positivkontrolle nach der Proben-Zugabe, die Negativkontroll-Gefäße müssen geschlossen werden.</li> </ul>
Die Fluoreszenzintensität variiert.	Inadäquate Zentrifugation der PCR-Streifen. Resuspendierung des lyophilisierten Pellets nur im oberen Teil des Reaktionsgefäßes.	PCR-Streifen immer abzentrifugieren.
	Die Oberfläche der Gefäße oder der Deckel ist verschmutzt (z.B. bei direktem Hautkontakt).	Tragen Sie immer Handschuhe beim Umgang mit den Gefäßen und Deckeln.
Pellets sind schwer lösbar.	Der lyophilisierte PCR-Mix beginnt zu rehydrieren.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Der lyophilisierte PCR-Mix sollte immer im Aluminiumbeutel mit den Trockenmittelbeuteln gelagert werden.</li> <li>Die Streifen dürfen erst kurz vor der Befüllung geöffnet werden.</li> </ul>

A T C A T C G T A T C C A T C C C T A T C C A T C C C T  
T C A T C C C T A T C G C T T C C A T C T G C T T C A  
A T C T T C A T C C G T A T C T G C T T C C A T C T G C T  
C C A T T T C A T C C G T A T C  
G C T T C C A T C C C T A T C G C  
T C A T C C A T C C C T A T C T G C T T C C A T C T G C T



## H. Symbole

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

## Änderungsindex

Version 1: Vorversion

Version 2: Finale Version nach Abstimmung mit dem FLI

Version 3: Hinweis auf Validierung gemäß DIN EN ISO 16140-2:2016 eingefügt

 **BIOTECON Diagnostics GmbH**  
Hermannswerder 17  
14473 Potsdam – Germany  
Telefon +49 (0) 331 2300-200  
Fax +49 (0) 331 2300-299  
bcd@bc-diagnostics.com  
www.bc-diagnostics.com

**vetproof®** und **foodproof®** sind registrierte Marken von BIOTECON Diagnostics GmbH.  
**PikoReal®** ist ein Markenzeichen von Thermo Fisher Scientific, **Stomacher®** ist ein Markenzeichen von Seward Limited.

V 900 27 23