

RIDA® GENE Gut Balance

REF PG0105



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Deutschland
Tel: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE Gut Balance ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen und quantitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Bacteroides*- und Cluster XIVa-DNA aus humanen Stuhlproben.¹

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Die normale humane Darmflora wird zu 90 % von zwei phylogenetischen Gruppen besiedelt, welche in einem symbiotischen Gleichgewicht agieren. *Bacteroides* sind anaerobe, gram-negative Bakterien, die Teil der Normalflora des Intestinaltraktes sind. Im Dickdarm befinden sich ca. 10^{11} *Bacteroides*/g Stuhl und sind somit zahlenmäßig hier die dominierenden Bakterien. Die zweite phylogenetische Gruppe sind die *Firmicutes*. *Clostridium* Cluster XIVa ist eine Klasse der *Firmicutes*, zu welcher u.a. *Eubacterium* spp. und *Roseburia* spp. gehören.

Verschiedene Quellen assoziieren ein Ungleichgewicht in der Komposition der Darmflora (Dysbiose) mit Adipositas (Fettleibigkeit).^{2,3} Hierbei korreliert eine niedrige *Bacteroides*-Keimzahl mit einer auftretenden Adipositas, während gleichzeitig eine erhöhte Zahl von *Eubacterium rectale* in Adipositas-Patienten nachgewiesen wurde.^{3,4}

3. Testprinzip

RIDA®GENE Gut Balance ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen und quantitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Bacteroides*- und Cluster XIVa-DNA in humanen Stuhlproben.

Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente für *Bacteroides*- und Cluster XIVa (16S-rRNA) amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplifikaten. Während der Extension trennt die

Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplifikate an. Mit Hilfe der im Kit enthaltenen Standards Standard A, Standard B und Standard C, ist eine Quantifizierung der Ergebnisse möglich. Der ermittelte DNA-Gehalt der Probe (Kopien/Reaktionsansatz) wird mit Hilfe eines Korrekturfaktors (K, siehe auch Tab. 12) in die Konzentrationseinheit Zellen/g Stuhl umgerechnet. Der RIDA®GENE Gut Balance Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau
10 ²	Standard A	1x	100 µl	dunkelblau
10 ⁴	Standard B	1x	100 µl	dunkelblau
10 ⁶	Standard C	1x	100 µl	dunkelblau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu **20 Mal** beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE Gut Balance multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab. 2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II

- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA-Präparation aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:3 mit Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 30 sec bei 1000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA®GENE Gut Balance Test enthält eine Internal Control DNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control DNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control DNA je Reaktion dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control DNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control DNA je Probe während der Extraktion eingesetzt werden. Die Internal Control DNA soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl pro Reaktion der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, die **No Template Control**, die **Internal Control DNA**, **Standard A**, **Standard B** und **Standard C** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

Proben: 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Standard (A, B, C): 5 µl **Standard** (A, B, C) zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Standards zu pipettieren.

Hinweis: Bei der Nutzung folgender Geräte muss bei jedem Lauf eine Standardkurve integriert werden: ABI 7500 (Applied Biosystems) und CFX96™ (Bio-Rad).

Für alle anderen Geräte kann eine Standardkurve exportiert und importiert werden. Folglich muss bei jedem neuen Lauf nur ein Punkt der Standardkurve (**Standard B**) als Kalibrator in das Experiment integriert werden. Die Applikation der Standardkurve ist für diese Geräte nur einmal pro Charge notwendig.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab.7, Tab.8).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 DNA real-time PCR Profil

Tab. 5: DNA real-time PCR Profil für LightCycler® 480 II und Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: DNA real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500 und CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Bei einer quantitativen Auswertung ist für **Standard A, **Standard B** und **Standard C** die Gesamtkopienanzahl je Reaktion in das Setup File des Softwareprogramms des jeweiligen real-time PCR-Gerätes einzutragen. Es werden 5 µl DNA eingesetzt, so dass sich folgende Konzentrationen ergeben:**

Standard A: 5 x 10² Kopien/Ansatz

Standard B: 5 x 10⁴ Kopien/Ansatz

Standard C: 5 x 10⁶ Kopien/Ansatz

Hinweis: Die Standardkurve kann für jeden Parameter auf dem real-time PCR-Gerät abgespeichert werden. Ausgenommen von dem ABI 7500 (Applied Biosystems) und dem CFX96™ (Bio-Rad) ist die Applikation der Standardkurve nur einmal pro Charge notwendig. Bei der Nutzung des ABI 7500 (Applied Biosystems) und des CFX96™ (Bio-Rad) muss bei jedem Lauf eine Standardkurve integriert werden. Für alle anderen Geräte muss bei jedem neuen Lauf nur ein Punkt der Standardkurve (Standard B**) als Kalibrator in das Experiment integriert werden.**

9.3.2 Universal real-time PCR-Profil

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

Tab. 7: Universal real-time PCR Profil für LightCycler® 480II

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 8: Universal real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Bei einer quantitativen Auswertung ist für **Standard A, **Standard B** und **Standard C** die Gesamtkopienanzahl je Reaktion in das Setup File des Softwareprogramms des jeweiligen real-time PCR-Gerätes einzutragen. Es werden 5 µl DNA eingesetzt, so dass sich folgende Konzentrationen ergeben:**

Standard A: 5 x 10² Kopien/Ansatz

Standard B: 5 x 10⁴ Kopien/Ansatz

Standard C: 5 x 10⁶ Kopien/Ansatz

Hinweis: Die Standardkurve kann für jeden Parameter auf dem real-time PCR-Gerät abgespeichert werden. Ausgenommen von dem ABI 7500

(Applied Biosystems) und dem CFX96™ (Bio-Rad) ist die Applikation der Standardkurve nur einmal pro Charge notwendig. Bei der Nutzung des ABI 7500 (Applied Biosystems) und des CFX96™ (Bio-Rad) muss bei jedem Lauf eine Standardkurve integriert werden. Für alle anderen Geräte muss bei jedem neuen Lauf nur ein Punkt der Standardkurve (**Standard B**) als Kalibrator in das Experiment integriert werden.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	<i>Bacteroides</i>	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
	Cluster XIVa	618/660	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Bacteroides</i>	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	Cluster XIVa	Cy5	
ABI 7500	<i>Bacteroides</i>	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Bacteroides</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Bacteroides</i>	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	
	Cluster XIVa	Red	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1, Abb. 2).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μl vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

Tab. 10: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	Nicht nachweisbar

**¹ Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

Wenn die Positivkontrolle nicht in dem angegebenen Ct-Bereich liegt, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

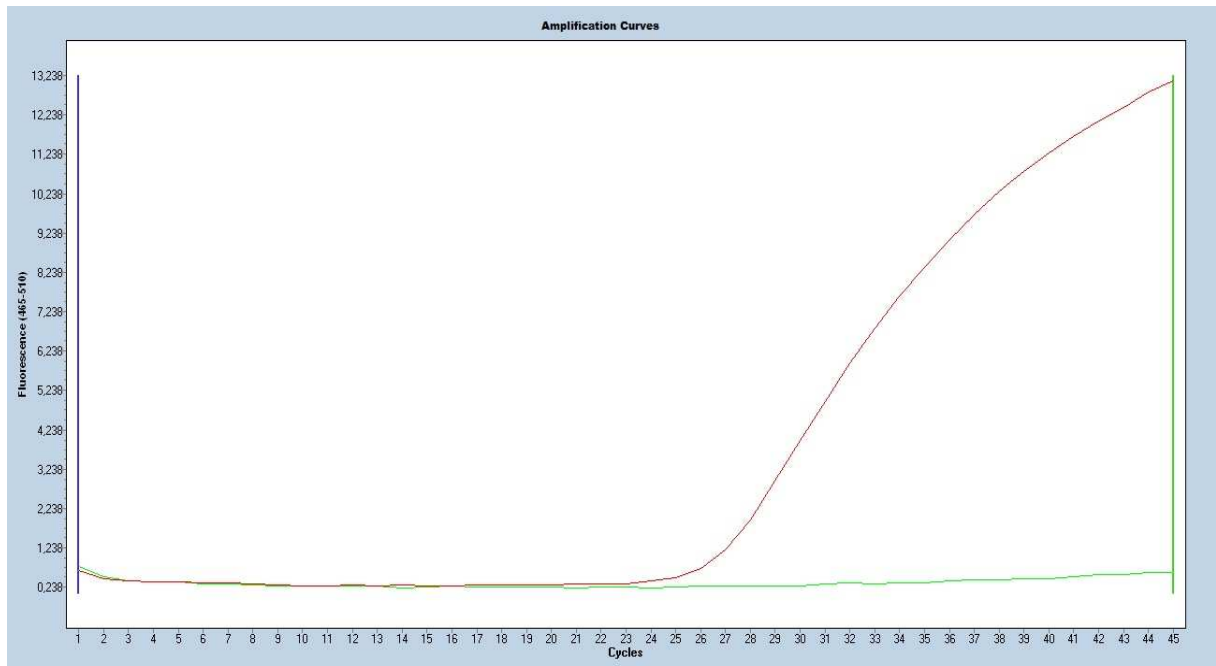


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Bacteroides*) auf dem LightCycler® 480II

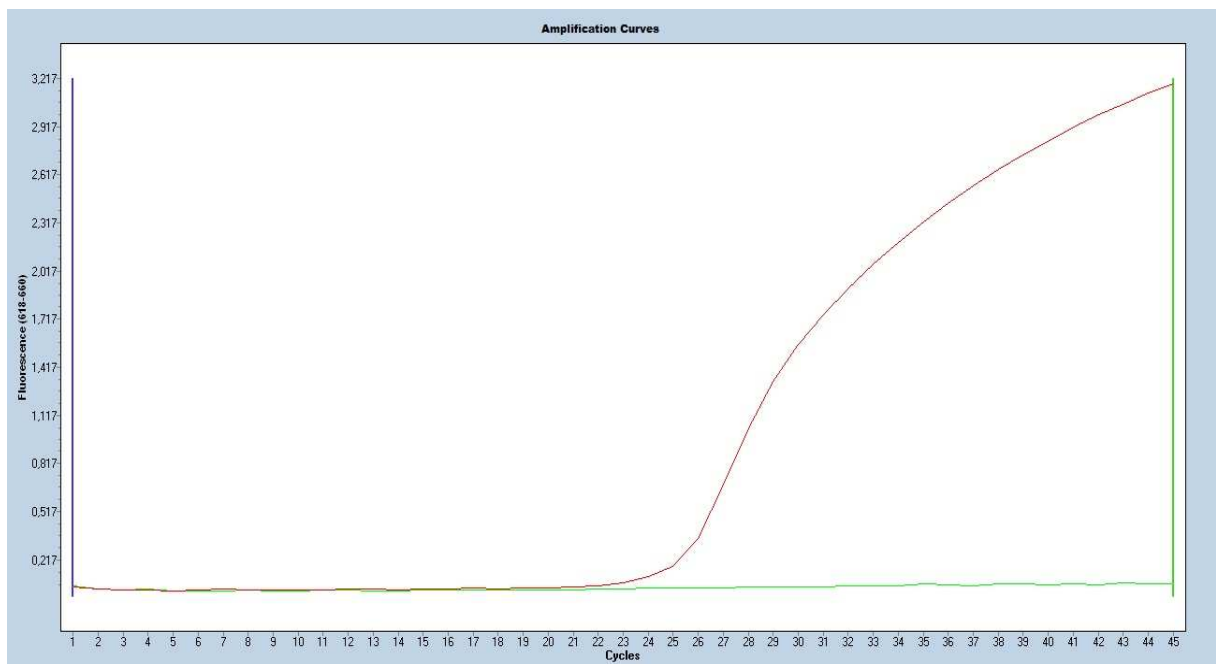


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (Cluster XIVa) auf dem LightCycler® 480II

10.1 Gültigkeit bei quantitativem Nachweis

Damit die Gültigkeit eines quantitativen PCR-Laufes gegeben ist, müssen alle Kontrollbedingungen eines gültigen qualitativen diagnostischen PCR-Laufes erfüllt sein. Für korrekte Quantifizierungsergebnisse muss zusätzlich eine gültige Standardkurve erstellt werden. Es müssen folgende Werte der Kontrollparameter einer Standardkurve erreicht werden:

	Kontrollparameter	Gültiger Wert
Roche LightCycler® 480II	Efficiency	1,9 – 2,1
	Slope	-3,1 – -3,6
Agilent Techn. Mx3005P	Rsq	> 0,98
	Y	-3,1 – -3,6
ABI 7500	R ²	> 0,98
	Slope	-3,1 – -3,6
Bio-Rad CFX96™	R ²	> 0,98
	Slope	-3,1 – -3,6
Qiagen Rotor-Gene Q	R ²	> 0,98
	M	-3,1 – -3,6

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

Tab. 11: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von			
<i>Bacteroides</i>	Cluster XIVa	ICD	Ergebnis
positiv	negativ	positiv/ negativ	<i>Bacteroides</i> nachweisbar*
negativ	positiv	positiv/ negativ	Cluster XIVa nachweisbar*
positiv	positiv	positiv/ negativ	<i>Bacteroides</i> und Cluster XIVa nachweisbar
negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar*
negativ	negativ	negativ	Ungültig

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, für die Internal Control DNA jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der Internal Control DNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control DNA führen können.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation zeigt, für die Internal Control DNA jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control DNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

***Hinweis:** Ein doppelt-negatives Ergebnis für *Bacteroides*-DNA bzw. Cluster XIVa-DNA ist unwahrscheinlich, da diese Bakteriengruppen Teil der humanen Normalflora ist. **Dies gilt entsprechend auch für ein negatives Ergebnis für nur eine der beiden Bakteriengruppen.** Bei einem doppelt-negativen Ergebnis für *Bacteroides*-DNA bzw. Cluster XIVa-DNA ist es wahrscheinlich, dass (bei Verwendung der ICD als Inhibitionskontrolle) die Probenextraktion nicht erfolgreich durchgeführt wurde. Bei einem doppelt-negativen Ergebnis für *Bacteroides*-DNA bzw. Cluster XIVa-DNA wird empfohlen die

Isolierung und Reinigung der Probe zu verbessern und die Amplifikation zu wiederholen.

11.1 Quantifizierung der Proben

Um *Bacteroides* und Cluster XIVA -positive Proben zu quantifizieren, muss eine Standardkurvenmessung mit **Standard A**, **Standard B** und **Standard C** durchgeführt werden. Diese muss separat abgespeichert werden und kann in Folgeläufen bei Produkten der gleichen Chargennummer wieder importiert und genutzt werden.

Hinweis: Dies gilt nicht für folgende Geräte: ABI 7500 (Applied Biosystems) und CFX96™ (Bio-Rad). Hier muss bei jedem Lauf eine Standardkurve integriert werden. Für alle anderen Geräte ist es bei jedem neuen Lauf erforderlich, dass ein Punkt der Standardkurve (Standard B**) als Kalibrator in das Experiment integriert wird.**

Für die Quantifizierung der Proben, bei denen *Bacteroides* und Cluster XIVA nachweisbar ist, werden die Reaktionen für die Standards (A, B und C), die Positivkontrolle und Negativkontrolle sowie die zu quantifizierenden Proben markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Ein korrektes Quantifizierungsergebnis ist nur zuverlässig möglich, wenn die Ct-Werte der *Bacteroides*- und Cluster XIVA-spezifischen Zielgene (16S-rRNA) im Ct-Bereich der Standards gemessen werden.

Mit der quantitativen RIDA®GENE Gut Balance multiplex real-time PCR wird der DNA-Gehalt des Parameters in Kopien/Reaktionsansatz ermittelt. Die Umrechnung in die Konzentrationseinheit Zellen/g Stuhl erfolgt über einen Korrekturfaktor K, welcher die Verdünnungen der DNA-Extraktion (abhängig vom verwendeten Extraktionskit oder –system), des PCR-Ansatzes (sowie die Anzahl der Zielsequenzen im gesamten Genom berücksichtigt).

Die Umrechnung des Ergebnisses der quantitativen RIDA®GENE Gut Balance multiplex real-time PCR in den Zellgehalt der Probe erfolgt mit folgender Formel:

$$\mathbf{C \text{ [Zellen/g Stuhl]} = c \text{ [Kopien/Reaktionsansatz]} \times K}$$

C [Zellen/g Stuhl]	- Bakterienkonzentration der Probe in Zellen / g Probe
c [Kopien/Reaktionsansatz]	- DNA-Konzentration im PCR-Reaktionsansatz (Ergebnis der quantitativen PCR)
K	- Korrekturfaktor

Für die Berechnung des Korrekturfaktors müssen folgende Größen/Informationen berücksichtigt werden:

- Probenvorverdünnung
- Eingesetztes Ausgangsvolumen der Probe für die DNA-Extraktion
- Anteil des DNA-Extrakts aus dem Gesamteluat, der in die PCR eingesetzt wird
- Anzahl der Zielsequenz im gesamten Genom

Tab. 12: Beispiel-Berechnung des Korrekturfaktors K bei einer Probenaufbereitung mit dem Maxwell® RSC (Promega) (bei Verwendung einer 1:3 verdünnten Probe)

Beschreibung	Faktor
Probenverdünnung 1:3 vor der Extraktion	x 3
300 µl Probeneinsatz in die Extraktion*	x 3,33
5 µl DNA-Extrakt-Einsatz in PCR**	x 20
a. Zielsequenz ist 6x im gesamten <i>Bacteroides</i> -Genom enthalten oder	a. x 0,167 (<i>Bacteroides</i>)
b. Zielsequenz ist 5x im gesamten Cluster XIVa-Genom enthalten	b. x 0,2 (Cluster XIVa)
Korrekturfaktor K für <i>Bacteroides</i>	0,33 x 10²
Korrekturfaktor K für Cluster XIVa	0,40 x 10²

* Ergebnis soll auf 1 g Stuhl bezogen sein

** Bezug auf gesamtes Eluat 100 µl (= 1/20)

Hinweis: Für weitere Informationen zur Quantifizierung der Proben wenden Sie sich bitte an mdx@r-biopharm.de.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Stuhlproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Gut Balance zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (16S-rRNA) vorhanden sind.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Der RIDA®GENE Gut Balance multiplex real-time PCR Test hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA Kopien/Reaktion für *Bacteroides* und Cluster XIVa.

Die folgenden Abbildungen 3 und 4 zeigen eine Verdünnungsreihe jeweils von *Bacteroides* und Cluster XIVa ($10^6 - 10^2$ DNA Kopien/ μl) auf dem LightCycler® 480II.

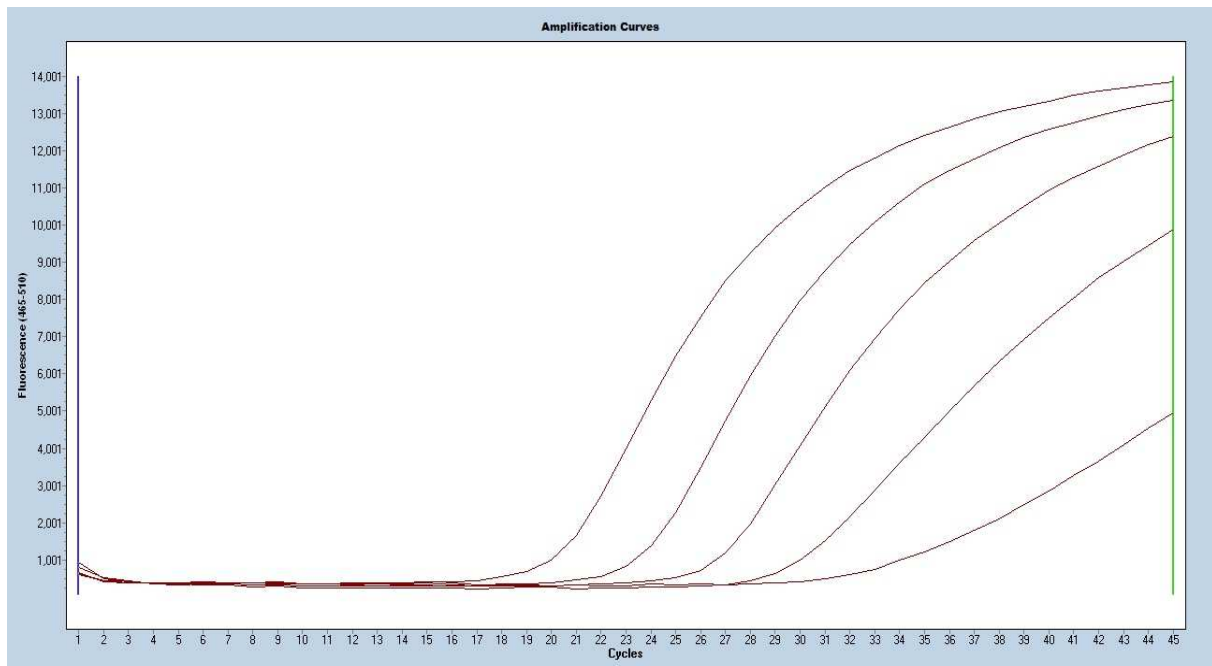


Abb. 3: Verdünnungsreihe *Bacteroides* ($10^6 - 10^2$ DNA Kopien/ μl) auf dem LightCycler® 480II

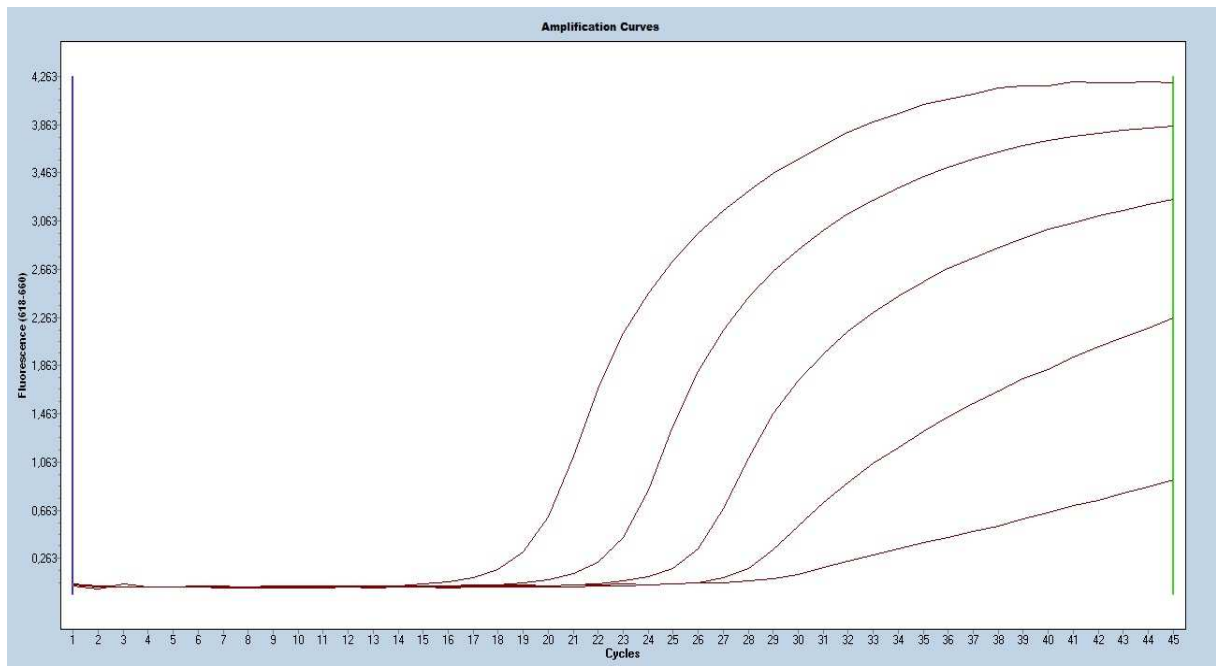


Abb. 4: Verdünnungsreihe Cluster XIVa ($10^6 - 10^2$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, der DNA-Extraktion und dem DNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Gut Balance multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Bacteroides* und Cluster XIVa. Es wurde keine Kreuzreaktivität zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 13). Die getesteten Spezies wurden mit dem RIDA®GENE Gut Balance multiplex real-time PCR Test und mittel Sequenzabgleich (*) überprüft.

Tab. 13: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Norovirus GG I*	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Norovirus GG II*	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Astrovirus Type 2	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Astrovirus Type 8	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i> *	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Lactobacillus ruminis</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i> *	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Gut Balance multiplex real-time PCR wurde mit exemplarisch mit verschiedenen Stämmen der *Bacteroides* und Cluster XIVa getestet (s. Tab. 14). Alle untersuchten Stämme wurden mit der RIDA®GENE Gut Balance multiplex real-time PCR und mittels Sequenzabgleich (*) nachgewiesen.

Tab. 14: Analytische Reaktivitätstestung










Bacteroides					
<i>Bacteroides acidifaciens</i> *	+	<i>Bacteroides fragilis</i>	+	<i>Bacteroides rodentium</i> *	+
<i>Bacteroides caccae</i> *	+	<i>Bacteroides gallinarum</i> *	+	<i>Bacteroides stercorisoris</i> *	+
<i>Bacteroides caecimuris</i> *	+	<i>Bacteroides helcogenes</i> *	+	<i>Bacteroides stercoris</i> *	+
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> *	+	<i>Bacteroides intestinalis</i> *	+	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> *	+
<i>Bacteroides clarus</i> *	+	<i>Bacteroides mediterraneensis</i> *	+	<i>Bacteroides timonensis</i> *	+
<i>Bacteroides dorei</i> *	+	<i>Bacteroides nordii</i> *	+	<i>Bacteroides uniformis</i> *	+
<i>Bacteroides eggerthii</i> *	+	<i>Bacteroides oleiciplenus</i> *	+	<i>Bacteroides xylanisolvens</i> *	+
<i>Bacteroides fingoldii</i> *	+	<i>Bacteroides ovatus</i> *	+		
Cluster XIVa					
<i>Acetivomaculum ruminis</i>	+	<i>Clostridium aminophilum</i>	+	<i>Eubacterium rectale</i>	+
<i>Clostridium aerotolerans</i>	+	<i>Clostridium clostridioforme</i>	+		

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-07-15	Generelle Überarbeitung 3. Testprinzip 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 7. Vorsichtsmaßnahmen 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 11. Interpretation der Ergebnisse 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

1. Matsuki. Real-time PCR Analysis of human intestinal microflora with 16S rRNA-gene-targeted Genus and species-specific primers. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
2. Mai V *et al.* Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutr. Journal* 2009, 8: 49 – 59.
3. Turnbaugh P *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009, 457(7228): 480 – 484.
4. Vaarala O. Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. *Rev. Diab. Stud.* 2013, 9(4): 251 - 259.