



RIDA[®]GENE Gut Balance

REF PG0105



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



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA®GENE Gut Balance es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa y cuantitativa directa de ADN de *Bacteroides* y el grupo XIVA a partir de muestras de heces humanas.¹

2. Resumen y descripción del ensayo

El 90 % de la flora intestinal humana normal está compuesto por dos grupos filogenéticos presentes en un equilibrio simbiótico. Las *Bacteroides* son bacterias gramnegativas que forman parte de la microbiota intestinal normal del tubo digestivo. En el intestino grueso, existen aproximadamente 10^{11} *Bacteroides*/g de heces y, en términos de cantidad, son las bacterias dominantes. El segundo grupo filogenético son los *firmicutes*. El grupo XIVA de *Clostridium* es una clase de *firmicutes* a la que pertenecen *Eubacterium* spp. y *Roseburia* spp., entre otros.

Distintas fuentes asocian un desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal (disbiosis) con la obesidad.^{2,3} La presencia de obesidad se relaciona con un menor número de *Bacteroides* y al mismo tiempo, se detectó un mayor número de *Eubacterium rectale* en pacientes obesos.^{3,4}

3. Principio del ensayo

RIDA®GENE Gut Balance es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa y cuantitativa directa de ADN de *Bacteroides* y el grupo XIVA en muestras de heces humanas.

Después del aislamiento del ADN, ocurre la amplificación del fragmento génico (si está presente) específico de *Bacteroides* y el grupo XIVA (ARNr 16S). Las dianas amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. Con los estándares **Standard A**, **Standard B** y **Standard C**, incluidos en el kit, es posible cuantificar los resultados. La cantidad de ADN identificada en la muestra (copias/reacción) se convierte en unidades de concentración células/g de heces con un factor de corrección (K, consulte también la tabla 12). El kit de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Gut Balance contiene un **Internal Control DNA** (ICD) que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rojo
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul
10 ²	Standard A	1x	100 µl	azul oscuro
10 ⁴	Standard B	1x	100 µl	azul oscuro
10 ⁶	Standard C	1x	100 µl	azul oscuro

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben almacenarse lejos de la luz a -16 °C y -28 °C ,y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez alcanzada la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a entre 2 °C y 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente dividir en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de manera adecuada (a entre 2 °C y 8 °C).

6. Reactivos necesarios no suministrados

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Gut Balance es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Equipo de PCR en tiempo real:	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua sin nucleasas)

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso.

Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ADN a partir de muestras de heces humanas, use un kit de aislamiento de ADN (como RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recomienda diluir las muestras de heces 1:3 con agua antes de la extracción. Agite intensamente en un mezclador vórtex la muestra de heces diluida y centrifúguela a 1000 x g durante 30 segundos. Use el volumen adecuado de sobrenadante según las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA[®]GENE Gut Balance contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción.

El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte la tabla 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control**, el **Internal Control DNA**, y el **Standard A**, **Standard B** y **Standard C** antes de usarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante la etapa de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

Tabla 4: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
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
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

Control negativo: Agregue 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

Muestra: Agregue 5 µl de eluato a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Agregue 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Estándar (A, B, C): Agregue 5 µl de **Standard** (A, B, C) a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR de los estándares.

Nota: El uso de los siguientes cicladores requiere que se incluya una curva estándar en cada análisis: ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad).

En todos los demás cicladores solo es necesario incluir una muestra de la curva estándar (Standard B**) como calibrador en la preparación experimental de cada nuevo análisis de PCR en tiempo real. Aquí, solo es necesaria la aplicación de una curva estándar una vez por número de lote.**

Tape los tubos o la placa. Centrifúgelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7, 8).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil de ADN por PCR en tiempo real para los equipos LightCycler® 480II y Rotor-Gene Q

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil de ADN por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Nota: El número total de copias por reacción de **Standard A**, **Standard B** y **Standard C** debe anotarse en el archivo de configuración (archivo Setup) del programa de software del ciclador de la PCR en tiempo real que corresponda. Se emplea un volumen total de 5 µl de ADN para obtener las siguientes concentraciones:

Estándar A: 5 x 10² copias/reacción

Estándar B: 5 x 10⁴ copias/reacción

Estándar C: 5 x 10⁶ copias/reacción

Nota: La curva estándar se puede guardar, para cada parámetro, en el ciclador de la PCR en tiempo real. Excepto en los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad), solo es necesario obtener la curva estándar una vez por cada número de lote. Los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad) requieren que se incluya una curva estándar en cada análisis. En todos los demás cicladores solo es

necesario incluir una muestra de la curva estándar (**Standard B**) como calibrador en la preparación experimental de cada nuevo análisis de PCR en tiempo real.

9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

Nota: El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN y ARN RIDA®GENE por PCR en tiempo real.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real en el LightCycler® 480II

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 8: Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500, CFX96™ y Rotor-Gene Q

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Nota: El número total de copias por reacción de **Standard A**, **Standard B** y **Standard C** debe anotarse en el archivo de configuración (archivo Setup) del programa de software del ciclador de la PCR en tiempo real que corresponda. Se emplea un volumen total de 5 µl de ADN para obtener las siguientes concentraciones:

Estándar A: 5×10^2 copias/reacción

Estándar B: 5×10^4 copias/reacción

Estándar C: 5 x 10⁶ copias/reacción

Nota: La curva estándar se puede guardar, para cada parámetro, en el ciclador de la PCR en tiempo real. Excepto en los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad), solo es necesario obtener la curva estándar una vez por cada número de lote. Los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad) requieren que se incluya una curva estándar en cada análisis.

En todos los demás cicladores solo es necesario incluir una muestra de la curva estándar (Standard B) como calibrador en la preparación experimental de cada nuevo análisis de PCR en tiempo real.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 480II	<i>Bacteroides</i>	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
	Grupo XIVa	618/660	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Bacteroides</i>	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICD	HEX	
	Grupo XIVa	Cy5	
ABI 7500	<i>Bacteroides</i>	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICD	VIC	
	Grupo XIVa	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Bacteroides</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	Grupo XIVa	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Bacteroides</i>	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICD	Amarillo	
	Grupo XIVa	Rojo	

10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figuras 1 y 2) para determinar que un ensayo es válido.

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

Tabla 10: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	ND *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	No es detectable

*1 No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo sea positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

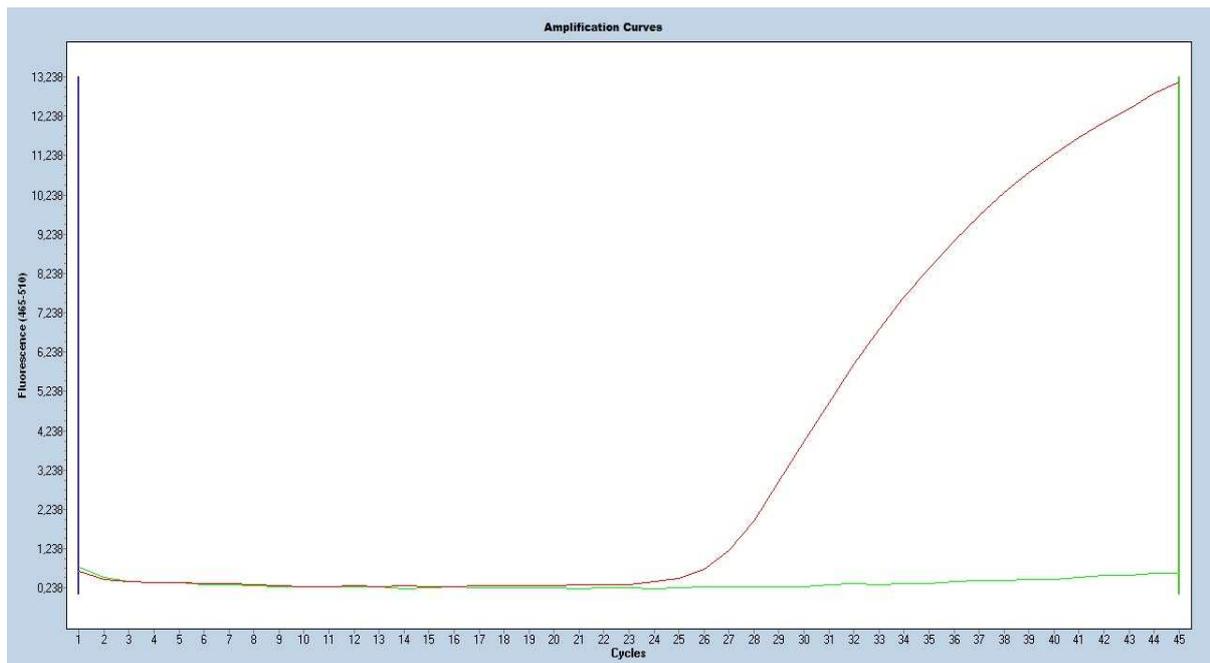


Figura 1: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Bacteroides*) en el LightCycler® 480II

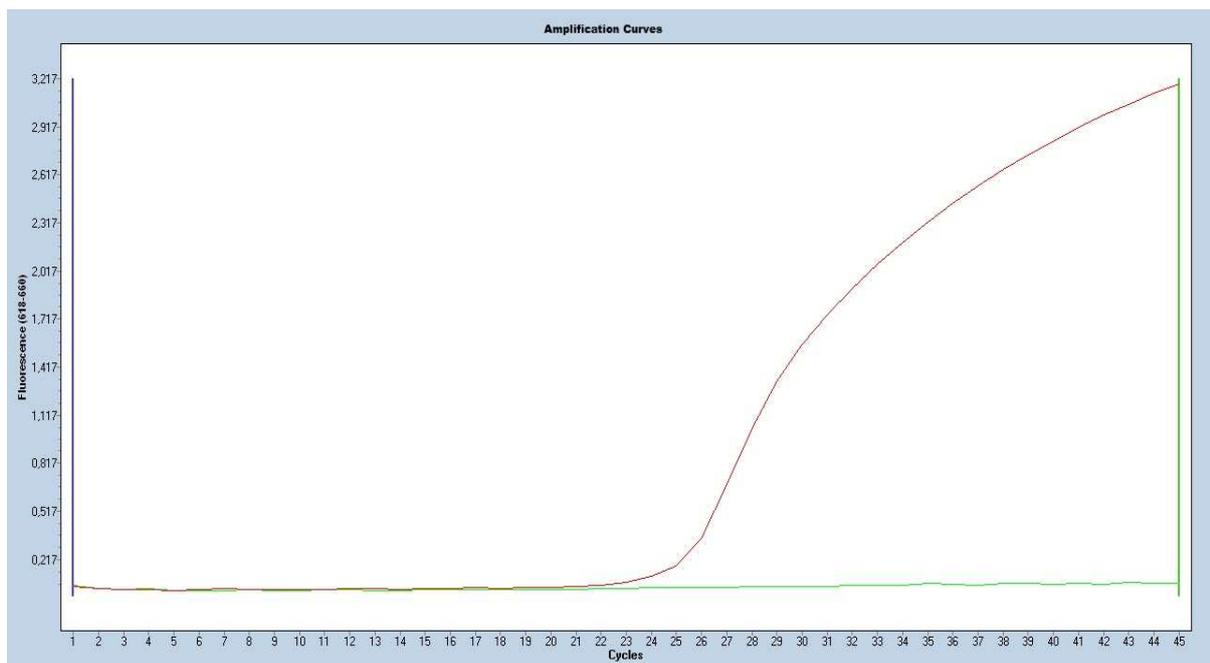


Fig. 2: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (Grupo XIVa) en el LightCycler® 480II

10.1 Validez de la detección cuantitativa

Para que la prueba diagnóstica cuantitativa sea válida, se deben cumplir todas las condiciones de control de una prueba diagnóstica cualitativa válida. Además, para obtener resultados de cuantificación exactos, se debe generar también una curva estándar válida. Para tener una prueba diagnóstica cuantitativa válida, los parámetros de control de la curva estándar deben alcanzar los siguientes valores.

	Parámetro de control	Valor válido
Roche LightCycler® 2.0	Eficiencia	1,9 – 2,1
Roche LightCycler® 480II	Eficiencia	1,9 – 2,1
	Pendiente	-3,1 – -3,6
Agilent Techn. Mx3005P	Rsq	>0,98
	Y	-3,1 – -3,6
ABI 7500	R ²	>0,98
	Pendiente	-3,1 – -3,6
Bio-Rad CFX96™	R ²	>0,98
	Pendiente	-3,1 - -3,6
Qiagen Rotor-Gene Q	R ²	>0,98
	M	-3,1 – -3,6

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

Tabla 11: Interpretación de las muestras

Genes diana			
<i>Bacteroides</i>	Grupo XIV	ICD	Resultado
positivo	negativo	positivo/ negativo	<i>Bacteroides</i> detectados*
negativo	positivo	positivo/ negativo	Grupo XIVa detectado*
positivo	positivo	positivo/ne gativo	<i>Bacteroides</i> y grupo XIVa detectados
negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados*
negativo	negativo	negativo	No válido

Se determina que una muestra es positiva si tanto el ADN de la muestra como el **Internal Control DNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

La muestra también se considera positiva si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La detección del control de amplificación interno no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control DNA** sea débil o esté ausente.

La muestra se considera negativa si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del ADN del **Internal Control DNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra ni del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

***Nota: Un resultado negativo doble del ADN de *Bacteroides* y del grupo XIVa es poco probable, ya que ambos grupos bacterianos son bacterias comensales humanas. Por tanto, esto también es válido para un resultado negativo para solo uno de los dos grupos de bacterias. Si se obtiene un resultado negativo doble para el ADN de *Bacteroides* y del grupo XIVa, es probable que, al usar el ICD como control de inhibición, la extracción de la muestra no haya sido correcta. Si se obtiene un resultado negativo doble para el ADN de *Bacteroides* y del grupo XIVa,**

se recomienda mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra, y repetir la amplificación.

11.1 Cuantificación de las muestras

Para cuantificar las muestras positivas para *Bacteroides* y el grupo XIVa, se debe procesar por separado una curva estándar con el **Standard A**, el **Standard B** y el **Standard C**. La medición de la curva estándar debe guardarse aparte. No obstante, se puede usar la medición de la misma curva estándar en todos los análisis con productos del mismo número de lote, importando el experimento guardado.

Nota: Esto no es válido con los siguientes cicladores: ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad). Aquí, es necesario medir una curva estándar con cada análisis. En todos los demás cicladores es necesario incluir una muestra de la curva estándar (Standard B**) en la preparación experimental como calibrador para cada nuevo análisis de PCR en tiempo real.**

Para cuantificar las muestras positivas para *Bacteroides* y el grupo XIVa, es necesario seleccionar y analizar todas las muestras de estándar (A, B y C), los controles positivo y negativo, y las muestras desconocidas que se desea cuantificar, siguiendo las instrucciones del fabricante del ciclador.

El ensayo cuantitativo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Gut Balance calcula la cantidad de ADN en copias/reacción del parámetro. La conversión a unidades de concentración (células/g de muestra de heces) se lleva a cabo con un factor de corrección K y se toman en cuenta las diluciones del procedimiento de extracción (dependiendo del kit de extracción usado) y la preparación de la PCR, así como el número de secuencias diana en el genoma completo.

La conversión del resultado del ensayo cuantitativo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Gut Balance a células/g de heces se lleva a cabo con la siguiente fórmula:

$$C \text{ [células/g de heces]} = c \text{ [copias/reacción]} \times K$$

C [células/g de heces] - concentración de bacterias en la muestra, en células/g de heces

c [copias/reacción] - concentración de ADN en la reacción de PCR
(resultado de la PCR cuantitativa)

K - factor de corrección

Para calcular el factor de corrección, hay que tener en cuenta la siguiente información:

- Dilución de las muestras
- Volumen inicial de muestra para la extracción del ADN
- ADN extraído del eluato total usado para la reacción de PCR
- Número de secuencias diana en el genoma completo

Tabla 12: Ejemplo de cálculo del factor de corrección con Maxwell® RSC (Promega) para la preparación de una muestra diluida 1:3

Descripción	Factor
Dilución 1:3 de la muestra antes de la extracción	x 3
300 µl de muestra para extracción*	x 3,33
5 µl de extracto de ADN en la reacción de PCR**	x 20
a. Secuencia diana contenida 6 veces en el genoma total de <i>Bacteroides</i> o	a. x 0,167 (<i>Bacteroides</i>)
b. Secuencia diana contenida 5 veces en el genoma total del grupo XIVa	b. x 0,2 (grupo XIVa)
Factor de corrección K para <i>Bacteroides</i>	0,33 x 10²
Factor de corrección K para el grupo XIVa	0,40 x 10²

* El resultado corresponde a 1 g de heces

** Correspondiente a un eluato total de 100 µl (= 1/20)

Nota: Para obtener más información sobre la cuantificación, póngase en contacto con mdx@r-biopharm.de.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces humanas.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA®GENE Gut Balance.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia de los genes diana (ARNr 16S).

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Gut Balance tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de ADN por reacción para *Bacteroides* y el grupo XIVa.

Las figuras 3 y 4, a continuación, muestran una dilución seriada de *Bacteroides* y el grupo XIVa ($10^6 - 10^2$ copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II.

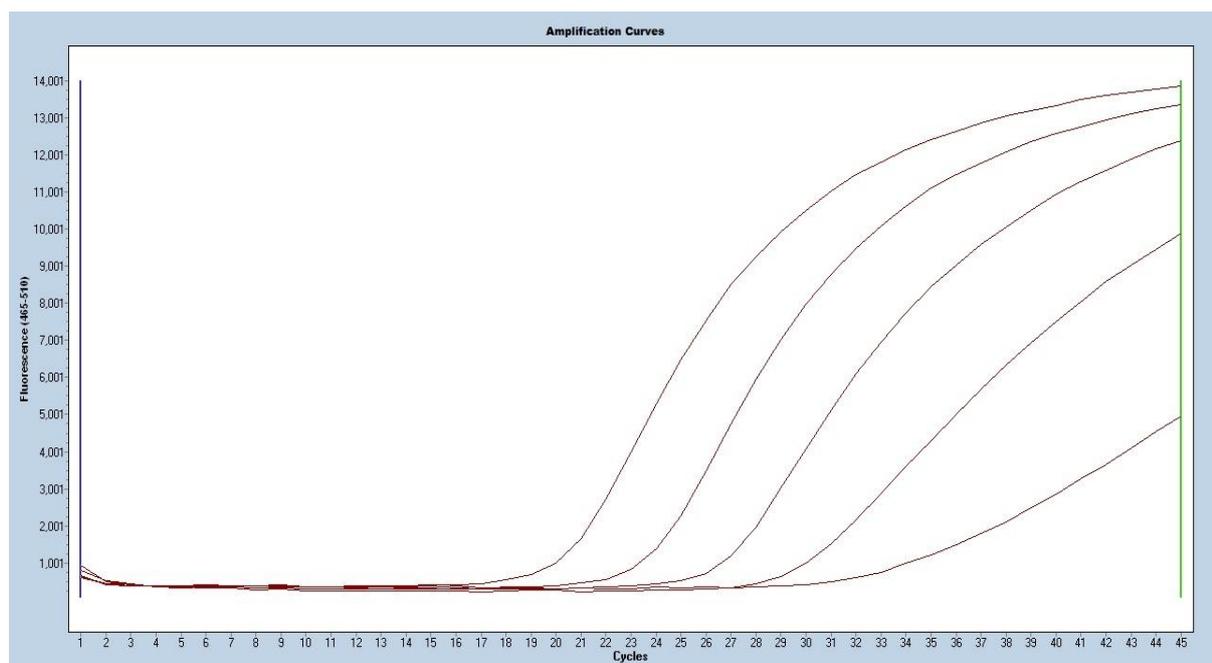


Fig. 3: Dilución seriada de *Bacteroides* (10^6 a 10^2 copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II

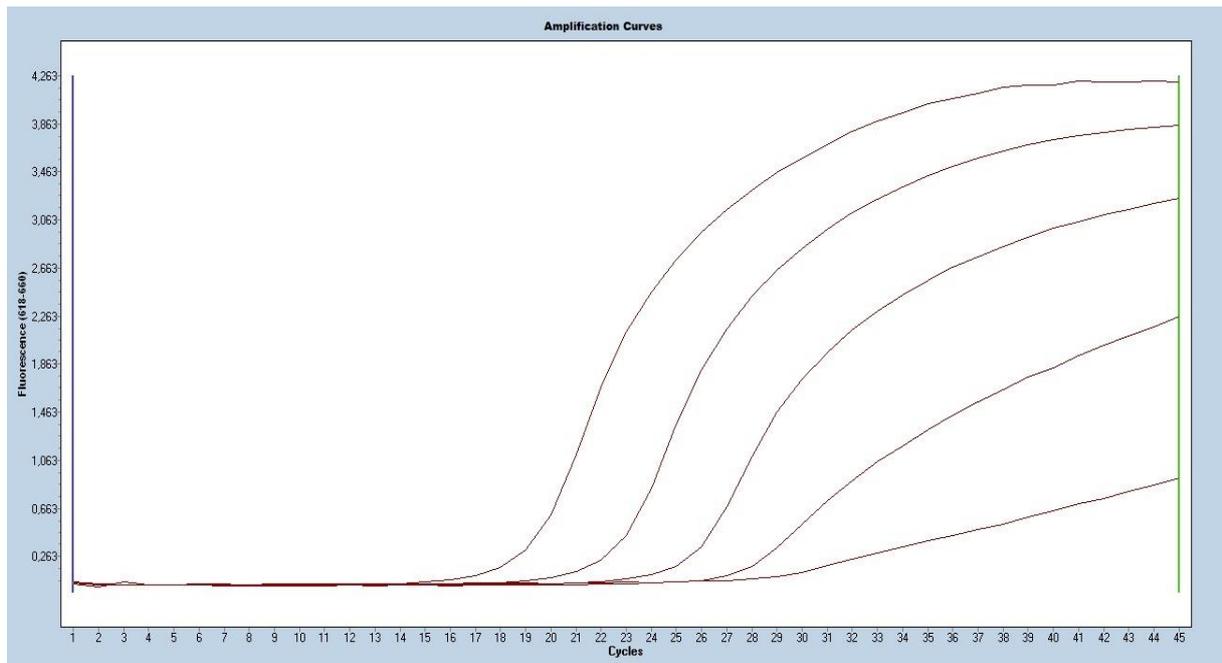


Fig. 4: Dilución seriada del grupo XIVa (10^6 a 10^2 copias de ADN por μ l) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

13.2 Especificidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Gut Balance es específico para *Bacteroides* y el grupo XIVa. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 13). Todas las cepas evaluadas se detectaron con el ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Gut Balance y mediante la alineación de secuencias (*).

Tabla 13: Ensayos de reactividad cruzada

Adenovirus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	<i>Campylobacter lari</i> subespecie <i>lari</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Norovirus GG* I	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Norovirus GG II*	-
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 41, humano, cepa 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 tipo 2	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Astrovirus tipo 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 clon 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 salivaris</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

13.3 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Gut Balance se evaluó en comparación con diferentes cepas de *Bacteroides* y el grupo XIVa (consulte la tabla 14). Todas las cepas evaluadas se detectaron con el ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Gut Balance o mediante la alineación de secuencias (*).

Tabla 14: Pruebas de reactividad analítica

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> *	+		
Grupo XIVa					
<i>Acetivomaculum ruminis</i>	+	<i>Clostridium aminophilum</i>	+	<i>Eubacterium rectale</i>	+
<i>Clostridium aerotolerans</i>	+	<i>Clostridium clostridioforme</i>	+		

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2019-07-15	Versión anterior
2023-03-01	5. Instrucciones de almacenamiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Bibliografía

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.