

## RIDA® GENE *Akkermansia muciniphila*

**REF** PG0145



## 1. Uso previsto

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

## 2. Resumen y descripción del ensayo

Cada vez es más evidente que la composición de la microbiota intestinal afecta a la salud humana y está relacionada con diferentes procesos patológicos, como las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), el síndrome metabólico y la obesidad.<sup>3,5</sup> En la actualidad, aún se desconoce si las alteraciones en la microbiota son la causa o el efecto de estas enfermedades.

*Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) es una bacteria gramnegativa que degrada mucina, y está presente naturalmente en la microbiota humana.<sup>1</sup> Representa entre 3 y 5 % de la población bacteriana de una persona sana. *A. muciniphila* se encuentra en zonas especiales de la mucosa humana y puede detectarse en muestras de heces de lactantes incluso de menos de un mes de edad.

Posteriormente, la cantidad de *A. muciniphila* aumenta con la edad. En las personas de edad avanzada, las cantidades de *A. muciniphila* son mucho más bajas.<sup>2</sup>

*A. muciniphila* puede estar parcialmente asociada con diabetes, adiposidad y EII.<sup>3,4</sup>

## 3. Principio del ensayo

RIDA® GENE Akkermansia muciniphila es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa y cuantitativa directa de *Akkermansia muciniphila* en muestras de heces humanas.

Después del aislamiento del ADN, ocurre la amplificación del fragmento génico (si está presente) específico de *Akkermansia muciniphila* (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. El kit de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Akkermansia muciniphila 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 <sup>2</sup>	Standard A	1x	100 µl	azul oscuro
10 <sup>4</sup>	Standard B	1x	100 µl	azul oscuro
10 <sup>6</sup>	Standard C	1x	100 µl	azul oscuro

#### 5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos contra la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de 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 (entre 2 °C y 8 °C).

## 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA<sup>®</sup> GENE Akkermansia muciniphila 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 <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC
Equipo de PCR en tiempo real:	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 2.0, LightCycler <sup>®</sup> 480II, LightCycler <sup>®</sup> 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 <sup>™</sup>
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](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA<sup>®</sup> GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para uso con el LightCycler<sup>®</sup> 2.0
- RIDA<sup>®</sup> GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler<sup>®</sup> 480II y LightCycler<sup>®</sup> 480 z
- 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. 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](http://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<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>GENE Akkermansia muciniphila 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 las tablas 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

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 extracto de ADN 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:** 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. Centrifúguelos 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 y 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 serie LightCycler® 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 10<sup>2</sup> copias/reacción

**Estándar B:** 5 x 10<sup>4</sup> copias/reacción

**Estándar C:** 5 x 10<sup>6</sup> 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 equipo LightCycler®

Transcripción inversa	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR 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

Transcripción inversa	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR 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 10<sup>2</sup> copias/reacción

Estándar B:  $5 \times 10^4$  copias/reacción

Estándar C:  $5 \times 10^6$  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® 2.0	<i>Akkermansia muciniphila</i>	530	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Akkermansia muciniphila</i>	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Akkermansia muciniphila</i>	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
ABI 7500	<i>Akkermansia muciniphila</i>	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Akkermansia muciniphila</i>	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICD	HEX	
Bio-Rad CFX96™	<i>Akkermansia muciniphila</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Akkermansia muciniphila</i>	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICD	Amarillo	

## 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, figura 1) para determinar que un ensayo es válido.

El **Positive Control** tiene una concentración de  $10^3$  copias/ $\mu$ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de  $5 \times 10^3$  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 <sup>*1</sup>	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

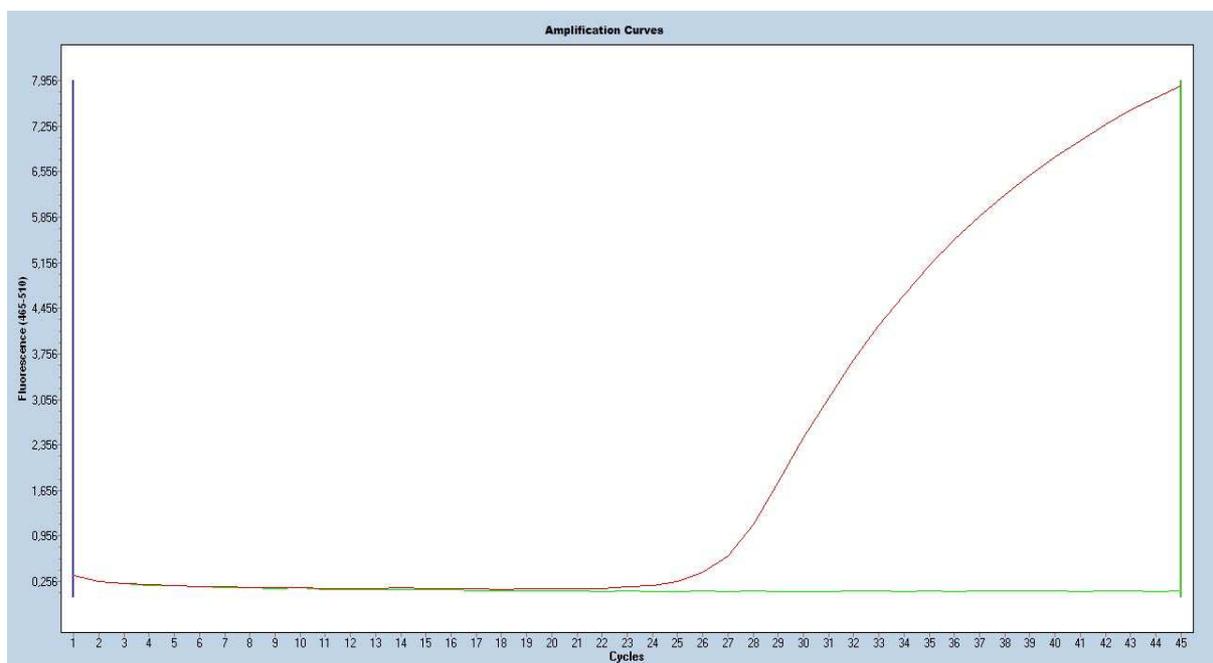
*\*1 No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo sea positivo.*

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



**Fig.1:** Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (*Akkermansia muciniphila*) 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
<b>Roche LightCycler® 2.0</b>	Eficiencia	1,896 – 2,102
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	Eficiencia	1,896 – 2,102
	Pendiente	-3,1 – -3,6
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	Rs <sub>q</sub>	> 0,98
	Y	-3,1 – -3,6
	Eficiencia (Eff.)	90 % – 110 %
<b>ABI 7500</b>	Pendiente	-3,1 – -3,6
	R <sup>2</sup>	> 0,98
	Eficiencia (Eff%)	90 % – 110 %
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	Eficiencia	90 % – 110 %
	R <sup>2</sup> curva estándar	> 0,98
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	M	3,1 – -3,6
	R <sup>2</sup>	> 0,98

## 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>Akkermansia muciniphila</i>	ICD	Resultado
positivo	positivo/negativo	<i>Akkermansia muciniphila</i> detectada
negativo*	positivo	Genes diana no detectados*
negativo	negativo	No válido

Se detecta *Akkermansia muciniphila* si el ADN de la muestra y el **Internal Control DNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se detecta *Akkermansia muciniphila* 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.

No se detecta *Akkermansia muciniphila* 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 **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:** Es poco probable que se obtenga un resultado negativo de ADN de *Akkermansia muciniphila*, ya que este grupo bacteriano pertenece a las bacterias comensales humanas. No obstante, existe una baja probabilidad de que las muestras de heces sean por naturaleza negativas para *Akkermansia muciniphila*. Si se obtiene un resultado negativo de ADN de *Akkermansia muciniphila*, 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 de ADN de *Akkermansia muciniphila*, 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 *Akkermansia muciniphila*, 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 *Akkermansia muciniphila*, es necesario seleccionar todas las muestras de estándar (A, B y C), los controles positivo y negativo, y las muestras problema que se desea cuantificar, y analizarlas siguiendo las instrucciones del fabricante del ciclador.

Con el ensayo cuantitativo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE *Akkermansia muciniphila*, se 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 *Akkermansia muciniphila* a células/g de heces se calcula 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 RIDA® Xtract para la preparación de una muestra diluida 1:3

Descripción	Factor
Dilución 1:3 de la muestra antes de la extracción	x 3
200 µl de muestra para extracción*	x 5
5 µl de extracto de ADN en la reacción de PCR (eluatado total 60 µl [= 1/12])	x 12
a. Secuencia diana contenida 3 veces en el genoma total de <i>Akkermansia</i>	x 1/6 ( <i>Akkermansia muciniphila</i> )
<b>Factor de corrección (K) para <i>Akkermansia muciniphila</i>**</b>	<b>0,6 x 10<sup>2</sup></b>

\* El resultado corresponde a 1 g de heces

\*\* Este valor puede guardarse en el instrumento de PCR en tiempo real

**Tabla 13:** 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
Secuencia diana contenida 3 veces en el genoma total de <i>Akkermansia muciniphila</i>	x 0,33 ( <i>Akkermansia muciniphila</i> )
<b>Factor de corrección K para <i>Akkermansia muciniphila</i>***</b>	<b>0,66 x 10<sup>2</sup></b>

\* El resultado corresponde a 1 g de heces

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

\*\*\* Este valor puede guardarse en el instrumento de PCR en tiempo real

**Nota:** Para obtener más información sobre la cuantificación, póngase en contacto con [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

## 12. Limitaciones del método

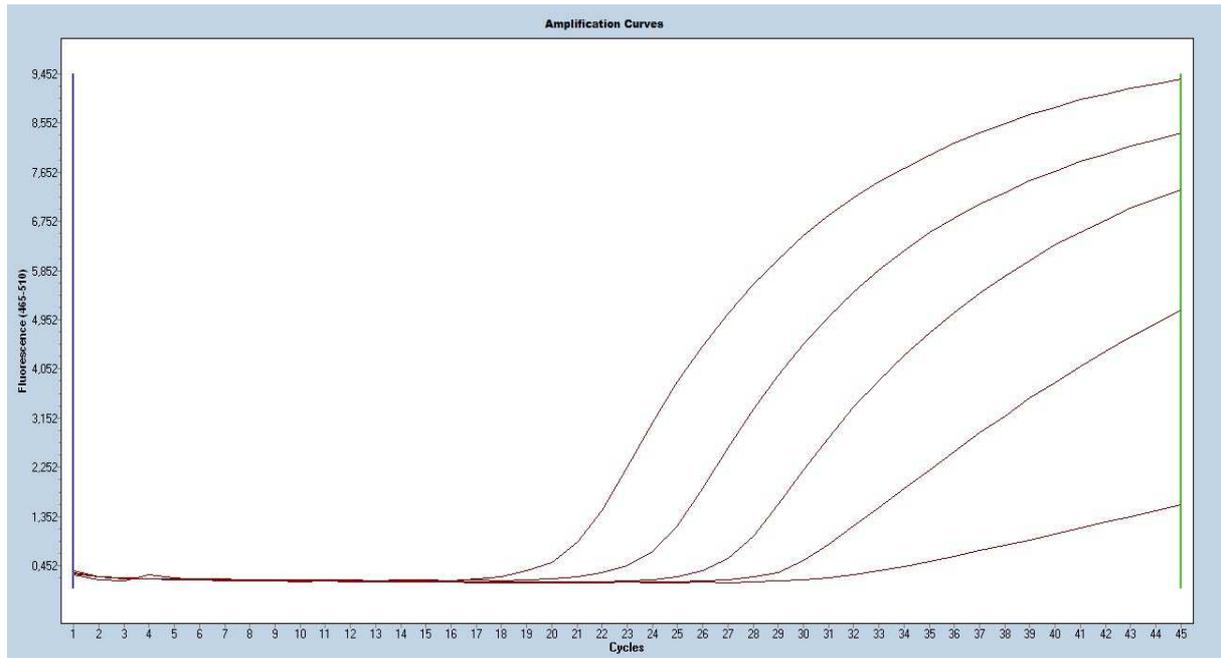
1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces humanas.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos 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 la detección de nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA<sup>®</sup>GENE Akkermansia muciniphila.
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).
8. La mucina, incluso en pequeñas cantidades, puede producir interferencias.

## 13. Características de rendimiento

### 13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE *Akkermansia muciniphila* tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de ADN por reacción para *Akkermansia muciniphila*.

En la figura 2, a continuación, se muestra una dilución seriada de *Akkermansia muciniphila* ( $10^6 - 10^2$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II.



**Fig. 2:** Dilución seriada de *Akkermansia muciniphila* ( $10^6 - 10^2$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) 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 Akkermansia muciniphila es específico para *Akkermansia muciniphila*. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 14):

**Tabla 14:** 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	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	Enterococcus faecium	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Bacteroides fragilis	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB clon C6	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
Bifidobacterium bifidum	-	<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>	-	Cryptosporidium muris	-	Lactobacillus ruminis	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	Cryptosporidium parvum	-	Lactobacillus salivaris	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

## 14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2018-11-12	Revisión general 4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 11. Interpretación de los resultados 12. Limitaciones del método 13. Características de rendimiento 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

## 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. Derrien M *et al.* Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Sys Evol Microbiology* 2004; 54: 1469-1476.
2. Collado MC *et al.* Intestinal integrity and Akkermansia muciniphila, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults and the elderly. *App Envir Microbiology* 2007; 73: 7767-7770.
3. Dao MC *et al.* Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2015; 0: 1-11.
4. Everard A *et al.* Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *PNAS* 2013; 110: 9066-9071.
5. Cani P *et al.* Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology* 2017; 8:1765.