

RIDA® GENE Faecalibacterium prausnitzii

REF PG0155



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 Faecalibacterium prausnitzii ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen und quantitativen Nachweis von *Faecalibacterium prausnitzii*-DNA in humanen Stuhlproben.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Faecalibacterium prausnitzii ist ein gram-positives, strikt anaerobes, kommensales Bakterium und gehört zur Familie der *Clostridiaceae*. *F. prausnitzii* gehört zu den wichtigsten menschlichen Darmbakterien und wurde mit einem Anteil von 5 - 10 % aller Bakterien, die in Stuhlproben gesunder Menschen detektiert werden, nachgewiesen.¹ *F. prausnitzii* befindet sich im hinteren Darmabschnitt in anaerober Umgebung.² Im Kindesalter ist die Anzahl an *F. prausnitzii* sehr klein und steigt nach Ansiedlung von erst-bildenden Bakterien.² Da *F. prausnitzii* strikt anaerob ist, ist eine Kultivierung sehr schwierig, was zur Folge hat, dass über deren Schutzmechanismus nur wenig bekannt ist. *F. prausnitzii* produziert Buttersäurederivate wie Butyrate, welche essentiell für die Darmaktivität sind. Butyrate spielen eine wichtige Rolle für den Stoffwechsel der Dickdarmschleimhaut. Diese dienen als Energiequelle für Kolonozyten, besitzen entzündungshemmende Eigenschaften, halten die Aktivität der bakteriellen Enzyme und somit die Funktionsabläufe im Dickdarm aufrecht.³ Veränderungen in der Anzahl an *F. prausnitzii* weisen auf Gleichgewichtsstörungen der Darmflora hin. Eine signifikant geringere Anzahl an *F. prausnitzii* wurde bei Patienten mit Diabetes und mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Reizdarmsyndrom) detektiert. Bei letzterem ist die Darmbarriere gestört bzw. die Darmwand ist durchlässiger. Dies verursacht einen unkontrollierten Stoffaustausch und führt folglich zu schweren Durchfallerkrankungen und Entzündungsreaktionen.

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE *Faecalibacterium prausnitzii* ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen und quantitativen Nachweis von *Faecalibacterium prausnitzii*-DNA in humanen Stuhlproben.

Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von *Faecalibacterium prausnitzii* (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 *Faecalibacterium prausnitzii* 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 Faecalibacterium prausnitzii 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® 2.0, 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 II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler® 2.0
- 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 Faecalibacterium prausnitzii 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® Serie 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: 5×10^2 Kopien/Ansatz

Standard B: 5×10^4 Kopien/Ansatz

Standard C: 5×10^6 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® Serie

<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® 2.0	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	530	RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	

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).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l 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

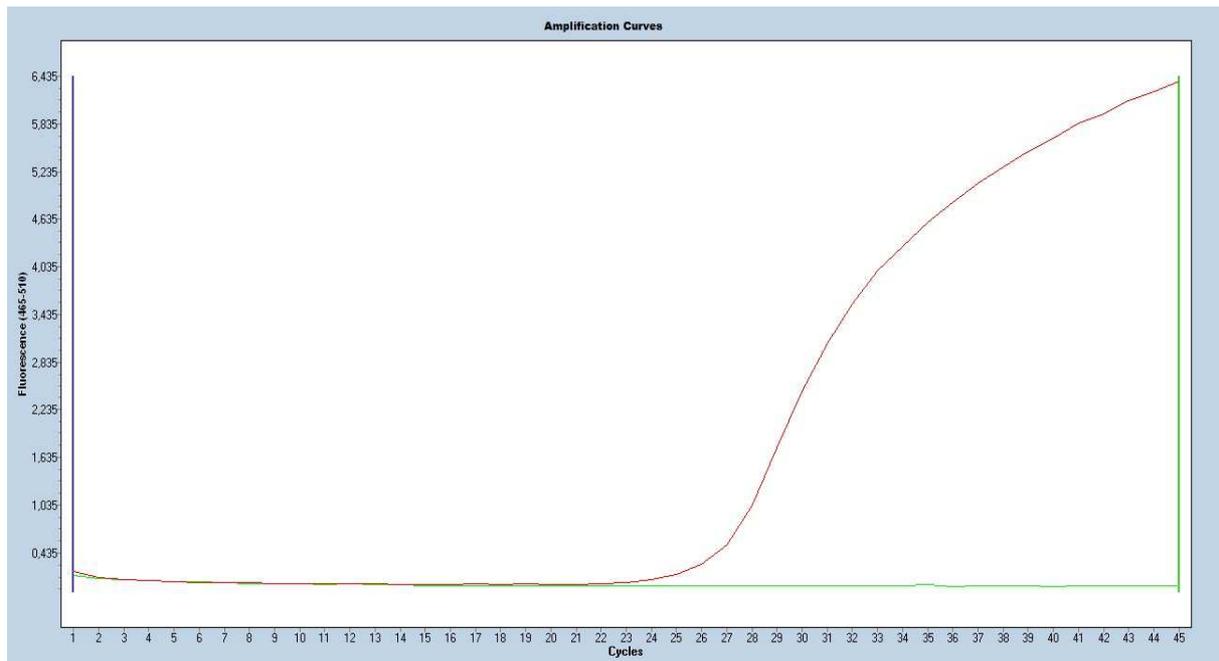


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Faecalibacterium prausnitzii*) auf dem LightCycler® 480II

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® 2.0	Efficiency	1,9 – 2,1
	Slope	-3,1 – -3,6
Roche LightCycler® 480II	Efficiency	1,9 – 2,1
	Slope	-3,1 – -3,6
Agilent Techn. Mx3005P	Rsq	> 0,98
	Slope	-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>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ICD	Ergebnis
positiv	positiv/ negativ	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> nachweisbar
negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar*
negativ	negativ	Ungültig

Faecalibacterium prausnitzii ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Faecalibacterium prausnitzii ist ebenfalls nachweisbar, 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.

Faecalibacterium prausnitzii ist nicht nachweisbar, 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 negatives Ergebnis für *Faecalibacterium prausnitzii*-DNA ist unwahrscheinlich, da diese Bakteriengruppe Teil der humanen Normalflora ist. Bei einem negativen Ergebnis für *Faecalibacterium prausnitzii*-DNA ist es wahrscheinlich, dass (bei Verwendung der ICD als Inhibitionskontrolle) die Probenextraktion nicht erfolgreich durchgeführt wurde. Bei einem negativen Ergebnis für *Faecalibacterium prausnitzii*-DNA wird empfohlen die Isolierung und Reinigung der Probe zu verbessern und die Amplifikation zu wiederholen.

11.1 Quantifizierung der Proben

Um *Faecalibacterium prausnitzii*-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 *Faecalibacterium prausnitzii* 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 des *Faecalibacterium prausnitzii*-spezifischen Zielgens (16S-rRNA) im Ct-Bereich der Standards gemessen werden.

Mit der quantitativen RIDA®GENE *Faecalibacterium prausnitzii* 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 *Faecalibacterium prausnitzii* multiplex real-time PCR in den Zellgehalt der Probe erfolgt mit folgender Formel:

C [Zellen/g Stuhl] = c [Kopien/Reaktionsansatz] x K

C [Zellen/g Stuhl]	- Bakterienkonzentration der Probe in Zellen/g Stuhl
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
Zielsequenz ist 5x im gesamten <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> -Genom enthalten	x 0,2 (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)
Korrekturfaktor K für <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ***	0,40 x 10²

* Ergebnis soll auf 1 g Stuhl bezogen sein

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

*** Dieser Wert kann im real-time PCR-Gerät abgespeichert werden

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 *Faecalibacterium prausnitzii* 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 Faecalibacterium prausnitzii multiplex real-time PCR Test hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA Kopien/Reaktion für *Faecalibacterium prausnitzii*.

Die folgende Abbildung 2 zeigt eine Verdünnungsreihe von *Faecalibacterium prausnitzii* ($10^6 - 10^2$ DNA Kopien/ μl) auf dem LightCycler® 480II.

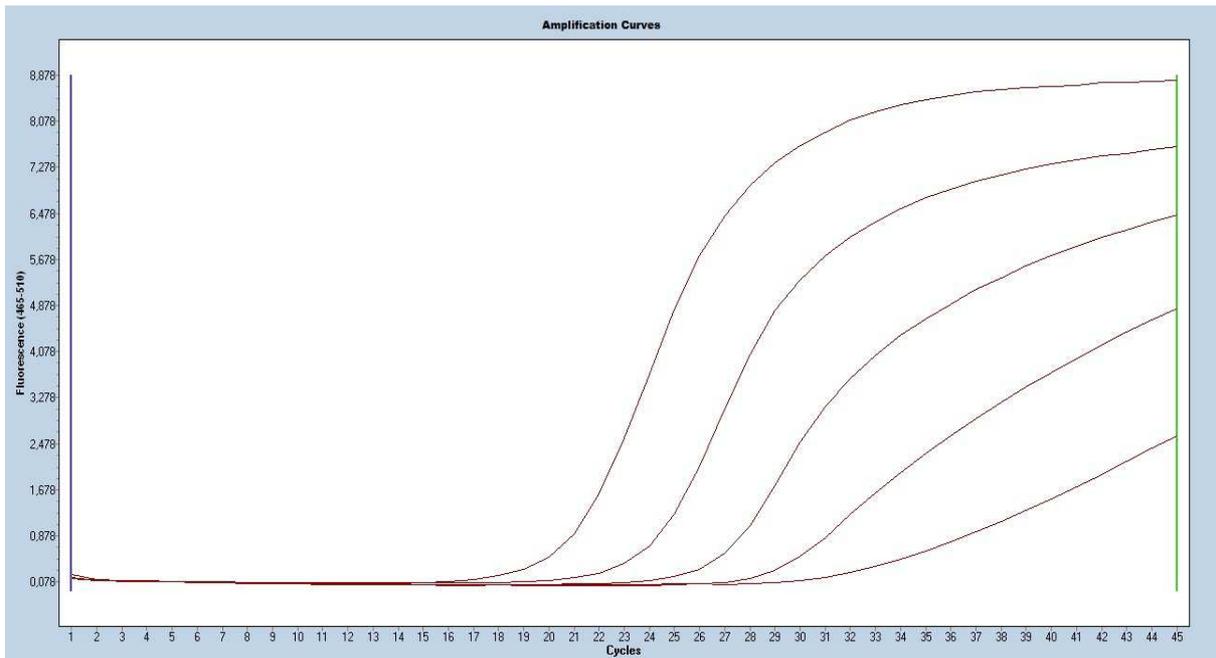


Abb. 2: Verdünnungsreihe *Faecalibacterium prausnitzii* ($10^6 - 10^2$ DNA Kopien/ μl) auf dem LightCycler® 480II

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

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE Faecalibacterium prausnitzii multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Faecalibacterium prausnitzii*. Es wurde keine Kreuzreaktivität zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 13).

Tab. 13: Kreuzreaktivitätstestung

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

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-07-01	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. Galecka M. *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* and Crohn's Disease – is There any Connection? Polish Journal of Microbiology 2013, Vol. 62, No 1, 91–95
2. Miquel S. *et al.* Identification of Metabolic Signatures Linked to Anti-Inflammatory Effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. mBio 2015, 6(2): e00300-15.
3. Kasper, H. Ernährungsmedizin und Diätetik. Kapitel 3, 162-211. Urban & Fischer Verlag; München/Jena 2000