

RIDA® GENE Gut Balance

REF PG0105



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



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA®GENE Gut Balance è un test di PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa e quantitativa diretta di DNA di *Bacteroides* e Cluster XIVa da campioni fecali umani.¹

2. Sintesi e spiegazione del test

Il 90 % della normale flora intestinale umana è popolata da due gruppi filogenetici che esistono in un equilibrio simbiotico. I *Bacteroides* sono batteri gram-negativi anaerobi che fanno parte della normale flora del tratto intestinale. Nel crasso, sono presenti circa 10^{11} *Bacteroides*/g di feci, e sono quindi i batteri dominanti in termini numerici. Il secondo gruppo filogenetico è costituito dai *firmicutes*. I *Clostridium* Cluster XIVa sono una classe di *firmicutes* a cui appartengono anche *Eubacterium* spp. e *Roseburia* spp.

Diverse fonti associano l'alterazione della composizione della flora intestinale (disbiosi) con l'obesità.^{2,3} In pazienti affetti da obesità, si registra infatti un ridotto numero di *Bacteroides* e allo stesso tempo un numero crescente di *Eubacterium rectale*.^{3,4}

3. Principio del test

RIDA®GENE Gut Balance è un test di PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa e quantitativa diretta di DNA di *Bacteroides* e Cluster XIVa da campioni fecali umani.

Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione del frammento genetico (se presente) specifico per *Bacteroides* e Cluster XIVa (16S-rRNA). I target amplificati vengono rivelati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la

Taq-Polymerase rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Con gli standard Standard A, Standard B e Standard C inclusi nel kit, è possibile quantificare i risultati. La quantità di DNA identificata nel campione (copie/reazione) viene convertita in concentrazione cellulare/g feci con un fattore di correzione (K, vedere anche la tabella 12). Il kit di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Gut Balance contiene un Internal Control DNA (ICD) che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e conferma che l'estrazione dell'acido nucleico è stata sufficiente.

4. Contenuto della confezione

Tabella 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu
10 ²	Standard A	1x	100 µl	blu scuro
10 ⁴	Standard B	1x	100 µl	blu scuro
10 ⁶	Standard C	1x	100 µl	blu scuro

5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservarli a una temperatura di -20 °C. Se non aperti, tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongelare accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2 - 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 20 cicli di congelamento/scongelamento senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati in ambiente freddo, in modo appropriato (2-8 °C).

6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Gut Balance è adatto per l'uso con le seguenti piattaforme di estrazione e strumenti per la PCR real-time:

Tabella 2: Attrezzatura necessaria

Piattaforma di estrazione	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Strumento per la PCR real-time:	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Avvertenze: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se per la PCR real-time si preferisce utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler® 480II

- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (priva di nucleasi)

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si manipolano i campioni o i reagenti.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in locali separati per evitare contaminazione crociata.

- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.
 - Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
- Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso.

Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com

8. Raccolta e conservazione di campioni

8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

Per l'isolamento del DNA da campioni di feci umane utilizzare un kit (ad es. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell® RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore. Prima dell'estrazione si raccomanda di diluire i campioni fecali con acqua in rapporto 1:3. Vorticare vigorosamente il campione di feci diluito e centrifugare a 1000 x g per 30 secondi. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA®GENE Gut Balance contiene un **Internal Control DNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tabella 4).

Se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione.

L'**Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10% a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tabella 3, Tabella 4). Prima dell'uso, scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare la [Reaction Mix], la [Taq-Polymerase], il [Positive Control], il [No Template Control], l'[Internal Control DNA] e gli standard [Standard A], [Standard B] e [Standard C]. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2-8 °C).

Tabella 3: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

Tabella 4: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
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
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

Controllo negativo: dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo negativo.

Campione: dispensare 5 µl di eluato nella Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: dispensare 5 µl di **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo positivo.

Standard (A, B, C): dispensare 5 µl di **Standard** (A, B, C) nella Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix degli standard.

Avvertenze: l'uso dei seguenti ciclatori richiede di inserire una curva standard ad ogni esecuzione: ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad).

Avvertenze: Per tutti gli altri ciclatori, nell'impostazione sperimentale come calibratore deve essere incluso solo un campione della curva standard (**Standard B**) per ogni nuova esecuzione di PCR real-time. In questi casi, l'applicazione di una curva standard è sufficiente per un'esecuzione per ciascun codice identificativo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione di PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tabella 5, Tabella 6, Tabella 7, Tabella 8).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo PCR real-time per DNA

Tabella 5: Profilo della PCR real-time del DNA per LightCycler® 480II e Rotor-Gene Q

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tabella 6: Profilo della PCR real-time del DNA per Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Avvertenze: occorre digitare il numero totale di copie per reazione di **Standard A**, **Standard B** e **Standard C** nel file di configurazione del software del ciclatore di PCR real time. Viene utilizzato un volume totale di 5 µl di DNA, che determina le seguenti concentrazioni:

Standard A: 5×10^2 copie/reazione

Standard B: 5×10^4 copie/reazione

Standard C: 5×10^6 copie/reazione

Avvertenze: Per ciascun parametro, è possibile salvare la curva standard sul ciclatore di PCR real-time. Salvo con i ciclatori ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad), è necessario eseguire la curva standard una sola volta per ciascun codice identificativo. Con ciclatori ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad), è invece necessario inserire una curva standard ad ogni

esecuzione. Per tutti gli altri ciclatori, nell'impostazione sperimentale come calibratore deve essere incluso solo un campione della curva standard (**Standard B**) per ogni nuova esecuzione di PCR real-time.

9.3.2 Profilo PCR real-time universale

Avvertenze: Il profilo per PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA®GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

Tabella 7: Profilo PCR real-time universale per il LightCycler® 480II

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tabella 8: Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI7500, CFX96™ e Rotor-Gene Q

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Avvertenze: occorre digitare il numero totale di copie per reazione di **Standard A**, **Standard B** e **Standard C** nel file di configurazione del software del ciclatore di PCR real time. Viene utilizzato un volume totale di 5 µl di DNA, che determina le seguenti concentrazioni:

Standard A: 5×10^2 copie/reazione

Standard B: 5×10^4 copie/reazione

Standard C: 5×10^6 copie/reazione

Avvertenze: Per ciascun parametro, è possibile salvare la curva standard sul ciclatore di PCR real-time. Salvo con i ciclatori ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad), è necessario eseguire la curva standard una sola volta per ciascun codice identificativo. Con ciclatori ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad), è invece necessario inserire una curva standard ad ogni esecuzione.

Per tutti gli altri ciclatori, nell'impostazione sperimentale come calibratore deve essere incluso solo un campione della curva standard (**Standard B**) per ogni nuova esecuzione di PCR real-time.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	<i>Bacteroides</i>	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
	Cluster XIVa	618/660	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Bacteroides</i>	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	ICD	HEX	
	Cluster XIVa	Cy5	
ABI 7500	<i>Bacteroides</i>	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Bacteroides</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Bacteroides</i>	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICD	Giallo	
	Cluster XIVa	Rosso	

10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, i controlli positivo e negativo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 10, Fig. 1, Fig. 2).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

Tabella 10: Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	Non rivelabile

*1 Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test

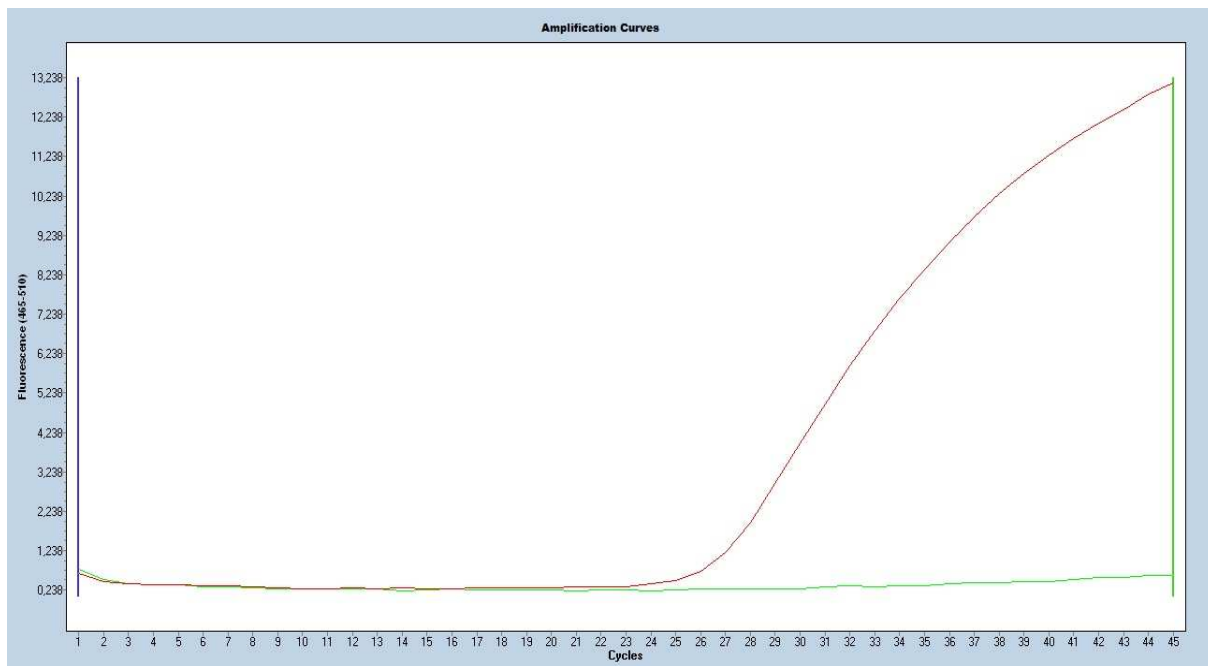


Figura 1: Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e negativo (verde) (*Bacteroides*) sul LightCycler® 480II

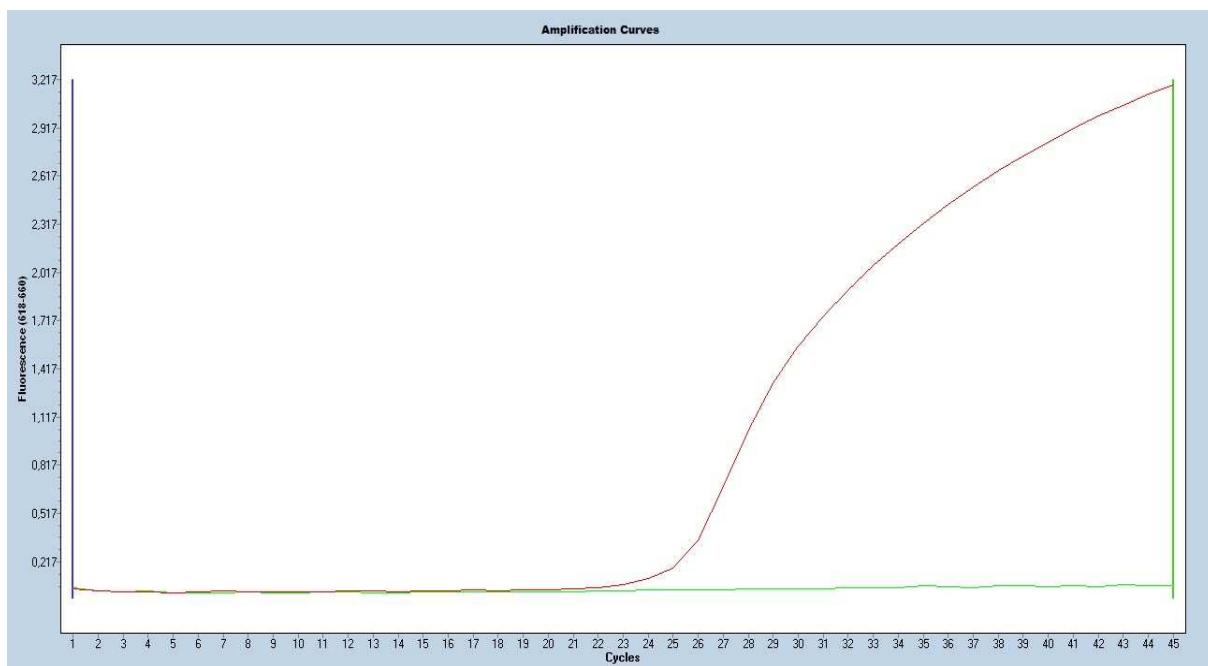


Figura 2: Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e negativo (verde) (Cluster XIVa) sul LightCycler® 480II

10.1 Validità della rivelazione quantitativa

Per la validità dell'esecuzione del test diagnostico quantitativo, occorre che siano soddisfatte tutte le condizioni di controllo applicabili ad un test valido. Per risultati di quantificazione accurati, occorre inoltre generare una curva standard valida. Per l'esecuzione di un test diagnostico quantitativo valido, si devono conseguire i seguenti valori dei parametri di controllo della curva standard.

	Parametro di controllo	Valore valido
Roche LightCycler® 2.0	Efficienza	1,9 – 2,1
Roche LightCycler® 480II	Efficienza	1,9 – 2,1
	Pendenza	-3,1 – -3,6
Agilent Techn. Mx3005P	Rsq	>0,98
	Y	-3,1 – -3,6
ABI 7500	R ²	>0,98
	Pendenza	-3,1 – -3,6
Bio-Rad CFX96™	R ²	>0,98
	Pendenza	-3,1 - -3,6
Qiagen Rotor-Gene Q	R ²	>0,98
	M	-3,1 – -3,6

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

Tabella 11: Interpretazione del campione

Geni target			
<i>Bacteroides</i>	Cluster XIV	ICD	Risultato
Positivo	Negativo	Positivo/ Negativo	<i>Bacteroides</i> rivelato*
Negativo	Positivo	Positivo/ Negativo	Cluster XIVa rivelato*
Positivo	Positivo	Positivo/Ne gativo	<i>Bacteroides</i> e ClusterXIVa rivelati
Negativo	Negativo	Positivo	Geni target non rivelati*
Negativo	Negativo	Negativo	Non valido

Un campione è valutato come positivo se sia il DNA del campione sia l'Internal Control DNA mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Un campione è valutato come positivo anche se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l'Internal Control DNA nel sistema di rivelazione. La rivelazione del controllo di amplificazione interno non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'Internal Control DNA sia debole o assente.

Un campione è valutato come negativo se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale di amplificazione per l'Internal Control DNA nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'Internal Control DNA esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l'Internal Control DNA mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene un inibitore della PCR. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

***Avvertenze:** Un doppio risultato negativo per DNA di *Bacteroides* e Cluster XIVa è improbabile, in quanto entrambi i gruppi batterici sono batteri commensali umani. **Di conseguenza, questa affermazione è anche valida in caso di risultato negativo per uno solo dei due gruppi di batteri.** Se si riscontra un doppio risultato negativo per DNA di *Bacteroides* e Cluster XIVa è verosimile che, utilizzando l'ICD come controllo di inibizione, l'estrazione del campione non sia avvenuta correttamente. In caso di doppio risultato negativo per DNA di *Bacteroides* e Cluster XIVa, si raccomanda di

migliorare l'isolamento e la purificazione del campione e di ripeterne l'amplificazione.

11.1 Quantificazione dei campioni

Per quantificare i campioni positivi a *Bacteroides* e Cluster XIVa, deve essere eseguita separatamente una curva standard con **Standard A**, **Standard B** e **Standard C**. La misurazione della curva standard deve essere salvata separatamente. Tuttavia, la stessa misurazione della curva standard è utilizzabile in tutte le esecuzioni con prodotti aventi lo stesso codice identificativo importando l'esperimento salvato.

Avvertenze: questo non è valido per i seguenti ciclatori: ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad). In questi casi, deve essere misurata una curva standard a ogni esecuzione. Per tutti gli altri ciclatori, nell'impostazione sperimentale come calibratore deve essere incluso un campione della curva standard (Standard B**) per ogni nuova esecuzione di PCR real-time.**

Per quantificare i campioni positivi a *Bacteroides* e Cluster XIVa, i campioni positivi, tutti i campioni standard (A, B e C), il controllo positivo e negativo e i campioni non noti da quantificare devono essere selezionati e analizzati in base alle istruzioni del produttore del ciclatore.

Con il kit quantitativo RIDA®GENE Gut Balance di PCR real-time multiplex viene calcolata la quantità di DNA del parametro in copie/reazione. La conversione in concentrazione cellulare/g di campione fecale viene eseguita con un fattore di correzione K e tiene conto delle diluizioni durante la procedura di estrazione (che dipendono dal kit di estrazione utilizzato) e dell'impostazione della PCR, oltre che del numero di sequenze target nel genoma intero.

La conversione del risultato del test quantitativo RIDA®GENE Gut Balance di PCR real-time multiplex in cellule/g di feci è calcolata con la seguente formula:

$$\mathbf{C \text{ [cellule/g di feci]} = c \text{ [copie/reazione]} \times K}$$

C [cellule/g di feci] - concentrazione batterica del campione espressa in cellule/g di feci

c [copie/reazione] - concentrazione di DNA nella reazione PCR
(risultato della PCR quantitativa)

K - fattore di correzione

Per il calcolo del fattore di correzione, considerare le seguenti informazioni:

- Diluizione del campione
- Volume iniziale del campione per l'estrazione del DNA
- Estratto di DNA dall'eluato totale utilizzato per la reazione PCR
- Numero di sequenze target nel genoma intero

Tabella 12: Esempio di calcolo del fattore di correzione utilizzando **Maxwell® RSC (Promega)** per la preparazione di un campione diluito 1:3

Descrizione	Fattore
Diluizione del campione 1:3 prima dell'estrazione	x 3
300 µl di campione per l'estrazione*	x 3,33
5 µl di DNA estratto nella reazione PCR**	x 20
a. Sequenza target contenuta 6 volte nel genoma completo di <i>Bacteroides</i> oppure	a. x 0,167 (<i>Bacteroides</i>)
b. Sequenza target contenuta 5 volte nel genoma completo di Cluster XIVA	b. x 0,2 (Cluster XIVA)
Fattore di correzione K per <i>Bacteroides</i>	0,33 x 10²
Fattore di correzione K per Cluster XIVA	0,40 x 10²

* Il risultato corrisponde a 1 g di feci

** Corrispondente a un eluato totale di 100 µl (= 1/20)

Avvertenze: Per ulteriori informazioni sulla quantificazione contattare mdx@r-biopharm.de.

12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di feci umane.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuove varianti, determinando un risultato falso negativo con il test RIDA®GENE Gut Balance.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza dei geni target (16S-rRNA).

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Gut Balance ha un limite di rivelazione ≥ 10 copie di DNA per reazione per *Bacteroides* e Cluster XIVa.

Le figure 3 e 4 seguenti mostrano una serie di diluizioni di *Bacteroides* e Cluster XIVa ($10^6 - 10^2$ copie di DNA per μl) sul LightCycler® 480II.

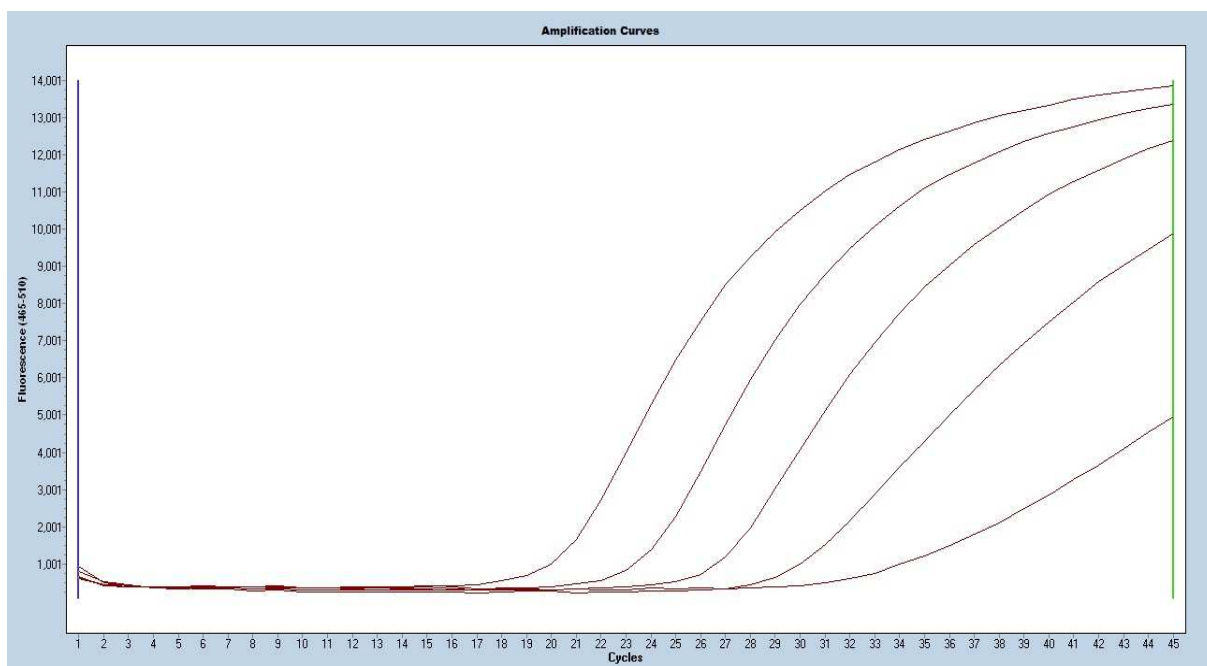


Figura 3: Serie di diluizioni di *Bacteroides* ($10^6 - 10^2$ copie di DNA per μl) sul LightCycler® 480II

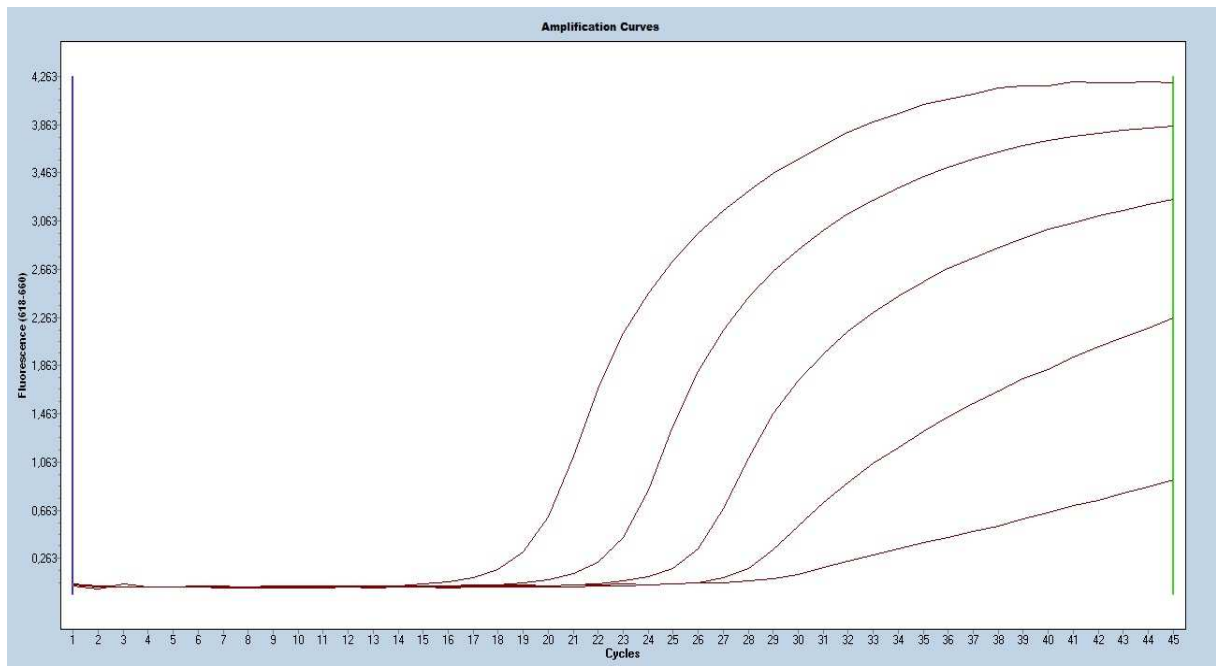


Figura 4: Serie di diluizioni di Cluster XIVa (10^6 - 10^2 copie di DNA per μ l) sul LightCycler® 480II

Il limite di rivelabilità dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

13.2 Specificità analitica

Il kit di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Gut Balance è specifico per *Bacteroides* e Cluster XIVa. Non è stata individuata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 13). Tutti i ceppi testati sono stati rivelati dal test di PCR real-time multiplex RIDAGENE Gut Balance e in base alla sequenza abbinata (*).

Tabella 13: Test di reattività crociata

Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Norovirus GG* I	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Norovirus GG II*	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifirmentans</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 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 salivaris</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

13.3 Reattività analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Gut Balance è stato valutato in modo tipico con diversi ceppi di *Bacteroides* e Cluster XIVa. (vedere Tabella 14). Tutti i ceppi testati sono stati rivelati con il test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Gut Balance o mediante allineamento di sequenze (*).

Tabella 14: Test di reattività analitica










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. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2019-07-15	Revisione generale 3. Principio del test 4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari 7. Precauzioni per gli utilizzatori 8. Raccolta e conservazione di campioni 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 11. Interpretazione del risultato 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici nel test

Non pertinente

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.