


RIDA[®] GENE Faecalibacterium prausnitzii
real-time PCR

Art. Nr.: PG0155
100 Reaktionen

Für die *in-vitro* Diagnostik.

 -20 °C



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



1. Verwendungszweck

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE *Faecalibacterium prausnitzii* ist eine 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 5-10 % in Stuhlproben gesunder Menschen detektiert.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 schwer, was zur Folge hat, dass über deren Schutzmechanismus nur wenig bekannt ist. *F. prausnitzii* produziert Buttersäurederivate wie Butyrate, welche essentiell für die Darmaktivität ist. Butyrate spielen eine wichtige Rolle für den Stoffwechsel der Dickdarmschleimhaut. Diese dienen als Energiequelle für Colonozyten, besitzen entzündungshemmende Eigenschaften und 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, IBS) und Diabetes 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 real-time PCR zum direkten quantitativen Nachweis von *Faecalibacterium prausnitzii* DNA in humanen Stuhlproben. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden, 16S-rRNA) die spezifischen Genfragmente für *Faecalibacterium prausnitzii* amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. 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 Amplikons an und wird mit der parallel laufenden Standard DNA A-, B- und C-Kurven verglichen. Die Ermittlung des DNA-Gehalts der Probe (Kopien/Reaktionsansatz) erfolgt mit der Umrechnung in die Konzentrationseinheit Zellen/g Stuhl mit Hilfe eines Korrekturfaktors (K, siehe auch Tab. 9 und Tab. 10). 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 1100 µl | gelb |
| 2 | Taq-Polymerase | 1x 11 µl | rot |
| D | Internal Control DNA | 2x 1800 µl | orange |
| N | PCR Water | 1x 500 µl | weiß |
| P | Positive Control | 1x 100 µl | hellblau |
| A | Standard DNA A | 1x 100 µl | dunkelblau |
| B | Standard DNA B | 1x 100 µl | dunkelblau |
| C | Standard DNA C | 1x 100 µl | dunkelblau |

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können 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 5 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 real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:
 - Extraktionsplattformen:
 - RIDA[®] Xtract
 - Maxwell[®] 16, Maxwell[®] RSC (Promega)
 - Real-time PCR-Gerät:
 - Roche: LightCycler[®] 2.0, LightCycler[®] 480II
 - Agilent Technologies: Mx3005P
 - Applied Biosystems: ABI 7500
 - Abbott: m2000rt
 - Bio-Rad: CFX96™
 - Cepheid: SmartCycler[®]
 - QIAGEN: Rotor-Gene Q
- Bemerkung: 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
- 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

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 Test 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 Material Safety Data Sheets (MSDS) unter www.r-biopharm.com

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1. DNA-Präparation

Für die DNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Isolierungskit (z.B. RIDA[®] Xtract) oder DNA-Extraktionsystem (z.B. Maxwell[®]16 (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 3.000 rpm zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®]GENE Faecalibacterium prausnitzii Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), die entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

Wird die Internal Control DNA (ICD) nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control DNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 3).

Wird die Internal Control DNA (ICD) als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden.

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 Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 2, Tab. 3). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, das **PCR Water** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 2: 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 | 19,9 µl | 218,9 µl |
| 2 | Taq-Polymerase | 0,1 µl | 1,1 µl |
| | Gesamt | 20 µl | 220 µl |

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

Tab. 3: 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 | 19,9 µl | 218,9 µl |
| 2 | Taq-Polymerase | 0,1 µl | 1,1 µl |
| D | Internal Control DNA | 1,0 µl | 11 µl |
| | Gesamt | 21,0 µl | 231,0 µl |

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

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

Negativkontrolle: Je 5 µl **PCR Water** zum vorgelegten Master-Mix als Negativkontrolle pipettieren.

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

Proben: Je 5 µl DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix der Probenreaktionen pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettieren.

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

Standard DNA (A, B, C): Je 5 µl **Standard DNA** (A, B, C) zum vorgelegten Master-Mix in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettieren.

Hinweis: Die Applikation der Standardkurve ist nur einmal pro Lotnummer notwendig.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz abzentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab.4, Tab.5).

9.3 Geräteeinstellungen

Tab. 4: Real-time PCR Profil für LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, SmartCycler® 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 |

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

Hinweis: Bei Verwendung des SmartCycler® (Cepheid) müssen die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 10.0 und für Kanal 2 auf 5.0 eingestellt werden. In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ individuell eingestellt werden müssen.

Tab. 5: Real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, m2000rt 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 |

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

Bemerkung: Eine minimale Annealing/Extension Zeit von 35 sec. wird für den m2000rt benötigt.

Hinweis: Für die Standard DNA A, B und C ist 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 DNA A: 5 x 10² Kopien

Standard DNA B: 5 x 10⁴ Kopien

Standard DNA C: 5 x 10⁶ Kopien

Bemerkung: Die Standardkurve kann für jeden Parameter auf dem real-time PCR Gerät abgespeichert werden. Ausgenommen von dem SmartCycler® (Cepheid, geschlossenes System), dem ABI 7500 (Applied Biosystems), dem m2000rt (Abbott) und dem CFX96™ (Bio-Rad) ist die Applikation der Standardkurve nur einmal pro Charge notwendig. Bei der Nutzung des SmartCycler® (Cepheid, geschlossenes System), des ABI 7500 (Applied Biosystems), des m2000rt (Abbott) 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 als Kalibrator in das Experiment integriert werden.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 6: 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 wird nicht benötigt |
| | ICD | 533/580 | |
| Cepheid SmartCycler® | <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | Kanal 1 | Stellen Sie die „Man. Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 10.0 und für Kanal 2 auf 5.0 ein * |
| | ICD | Kanal 2 | |
| ABI 7500 | <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | FAM | Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none |
| | ICD | VIC | |
| Abbott m2000rt | <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | FAM | - |
| | ICD | VIC | |
| Agilent Techn. Mx3005P | <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | FAM | Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none |
| | ICD | HEX | |
| Qiagen Rotor-Gene Q | <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | Green | Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 eingestellt sein |
| | ICD | Yellow | |
| Bio-Rad CFX96™ | <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | FAM | - |
| | ICD | VIC | |

*In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 individuell eingestellt werden müssen.

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 7 Abb. 1).

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

Tab. 7: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

| Probe | Ergebnis | ICD Ct | Zielgen Ct |
|--------------|-----------------|-------------------|-------------------------------------|
| PTC | Positiv | NA * ¹ | Siehe Quality Assurance Certificate |
| NTC | Negativ | Ct > 20 | 0 |

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

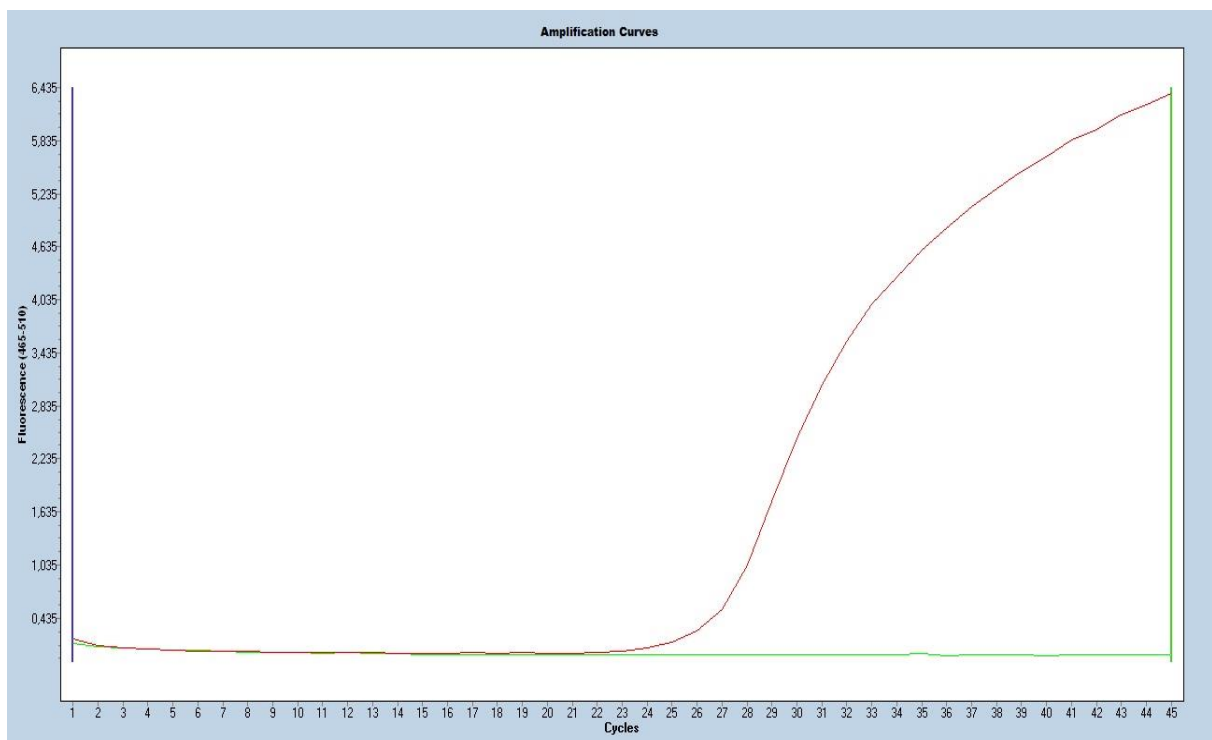
Wenn die Positivkontrolle (PTC) in dem angegebenen Ct-Bereich nicht detektiert wird, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Positivkontrolle neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle (NTC) nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Negativkontrolle 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
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten

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



11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 8.

Tab. 8: Interpretation der Ergebnisse

| <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | ICD | Ergebnis |
|-------------------------------------|-----------------|---|
| positiv | positiv/negativ | <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> nachweisbar |
| negativ* | positiv | Zielgen nicht nachweisbar * |
| negativ | negativ | Ungültig |

Faecalibacterium prausnitzii ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA (ICD) eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

Faecalibacterium prausnitzii ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem zeigt. Der Nachweis der Internal Control DNA (ICD) ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control DNA (ICD) führen können.

Faecalibacterium prausnitzii ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation, aber die Internal Control DNA (ICD) eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control DNA (ICD) ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. 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 sind. 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 DNA A, B und C separat 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: SmartCycler®(Cepheid), ABI 7500 (Applied Biosystems), m2000rt (Abbott) 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 als Kalibrator in das Experiment integriert wird.

Für die Quantifizierung der Proben, bei denen *Faecalibacterium prausnitzii* nachweisbar ist, werden die Reaktionen für die Standards (Standard DNA A, B und C), die Positiv- und Negativkontrolle sowie die zu quantifizierenden Proben markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert.

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

Mit der quantitativen RIDA[®]GENE Faecalibacterium prausnitzii real-time PCR wird der DNA-Gehalt des jeweiligen Parameters der Probe in Kopien/Reaktionsansatz ermittelt. Die Umrechnung in die Konzentrationseinheit Zellen/g Probe erfolgt über einen Korrekturfaktor K, welcher die Verdünnungen der DNA-Extraktion (abhängig vom verwendeten Extraktionskit) und des PCR-Ansatzes sowie die Anzahl der Zielsequenzen im gesamten Genom berücksichtigt.

Die Umrechnung des Ergebnisses der quantitativen RIDA[®]GENE Faecalibacterium prausnitzii real-time PCR in den Zellgehalt der Probe erfolgt mit folgender Formel:

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

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

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

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

Tab. 9: Beispiel Berechnung des Korrekturfaktors bei der Probenaufbereitung mit dem RIDA[®] Xtract Kit bei Verwendung einer 1:3 verdünnten Probe

| Beschreibung | Faktor |
|--|---|
| Probenverdünnung 1:3 vor der Extraktion | x 3 |
| 200 µl Probeneinsatz in die Extraktion* | x 5 |
| 5 µl DNA-Extrakt Einsatz in PCR ((gesamtes Eluat 60 µl (= 1/12)) | x 12 |
| a. Zielsequenz 5x im gesamten <i>Faecalibacterium</i> -Genom enthalten | x 1/5 (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>) |
| Korrekturfaktor (K) für <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>** | 0,36 x 10² |

* Ergebnis soll auf 1 g Stuhl bezogen sein

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

Tab. 10: Beispiel Berechnung des Korrekturfaktors bei der Probenaufbereitung mit dem Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit AS1290 (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 ((gesamtes Eluat 100 µl (= 1/20)) | x 20 |
| a. Zielsequenz 5x im gesamten <i>Faecalibacterium</i> -Genom enthalten | x 1/5 (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>) |
| Korrekturfaktor (K) für <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | 0,40 x 10² |

* Ergebnis soll auf 1 g Stuhl bezogen sein

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

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 Sondenbindungsregion 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

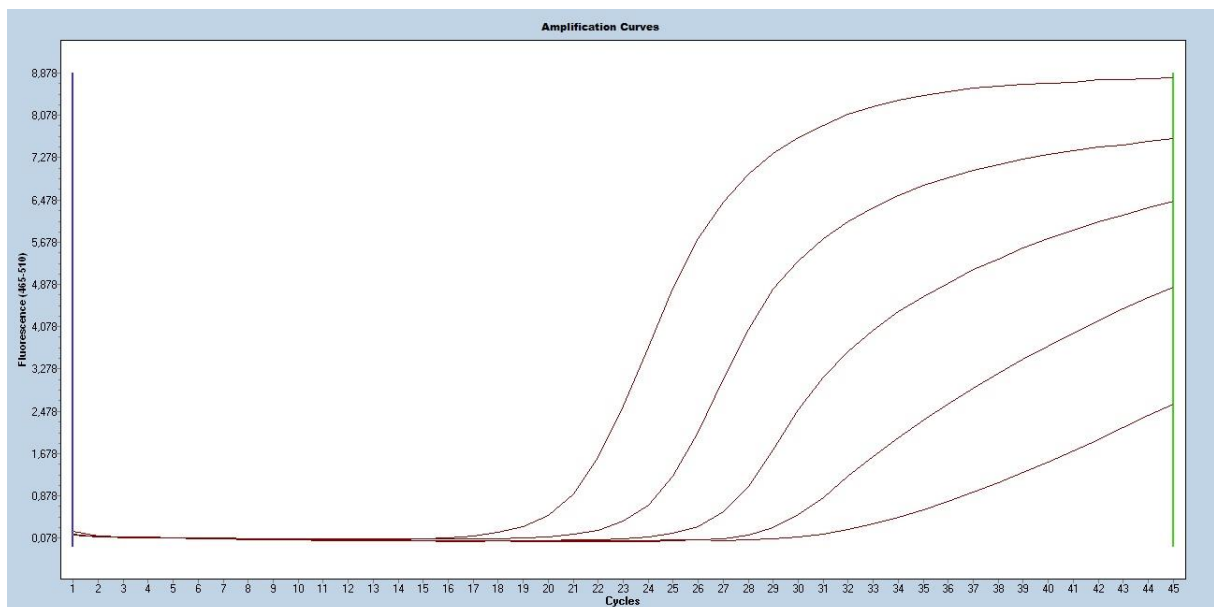
Organismus DNA vorhanden ist, da der RIDA[®]GENE Faecalibacterium prausnitzii Test die Zielgene für *Faecalibacterium prausnitzii* (16S-rRNA) detektiert.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®]GENE Faecalibacterium prausnitzii real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA-Kopien/Reaktion für *Faecalibacterium prausnitzii* (s. Abb. 2).

Abb. 2: Standardreihe *Faecalibacterium prausnitzii* ($10^6 - 10^2$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II



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










13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Faecalibacterium prausnitzii real-time PCR ist spezifisch für *Faecalibacterium prausnitzii* aus humanen Stuhlproben. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 11):

Tab. 11: Kreuzreaktivitätstestung

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

Symbolerklärungen

| | |
|---|------------------------------------|
|  | Für die <i>in-vitro</i> Diagnostik |
|  | Gebrauchsanweisung beachten |
|  | Lotnummer |
|  | verwendbar bis |
|  | Lagertemperatur |
|  | Artikelnummer |
|  | Anzahl der Präparationen |
|  | Herstellungsdatum |
|  | Hersteller |

Literatur

1. Galecka M. *Faecalibacterium prausnitzii* and Crohn's Disease – is There any Connection? Polish Journal of Microbiology 2013, Vol. 62, No 1, 91–95
2. Miquel S. Identification of Metabolic Signatures Linked to Anti-Inflammatory Effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. mBio 6(2):e00300-15. doi:10.1128/mBio.00300-15
3. Kasper, H. Ernährungsmedizin und Diätetik. Kapitel 3, 162-211. Urban & Fischer Verlag; München/Jena 2000