


RIDA[®] GENE Gut Balance
real-time PCR

Art. Nr.: PG0105
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 Gut Balance ist eine real-time multiplex PCR zum direkten qualitativen und quantitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Bacteroides*- und Cluster XIVA-DNA aus humanen Stuhlproben.¹

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Die normale humane Darmflora wird zu 90 % von zwei phylogenetischen Gruppen besiedelt, welche in einem symbiotischen Gleichgewicht agieren. *Bacteroides* sind anaerobe, gram-negative Bakterien, die Teil der Normalflora des Intestinaltraktes sind. Im Dickdarm befinden sich ca. 10^{11} *Bacteroides*/g Stuhl und sind somit zahlenmäßig hier die dominierenden Bakterien. Die zweite phylogenetische Gruppe sind die *Firmicutes*. *Clostridium* Cluster XIVA ist eine Klasse der *Firmicutes*, zu welcher u.a. *Eubacterium* spp. und *Roseburia* spp. gehören.

Verschiedene Quellen assoziieren ein Ungleichgewicht in der Komposition der Darmflora (Dysbiose) mit Adipositas (Fettleibigkeit).^{2,3} Hierbei korreliert eine niedrige *Bacteroides* Keimzahl mit einer auftretenden Adipositas, während gleichzeitig eine erhöhte Zahl von *Eubacterium rectale* in Adipositas-Patienten nachgewiesen wurde.^{3,4}

3. Testprinzip

RIDA®GENE Gut Balance ist eine real-time multiplex PCR zum direkten quantitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Bacteroides*- und Cluster XIVA-DNA aus humanen Stuhlproben. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente für *Bacteroides* und Cluster XIVA (16S-rRNA) 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 Gut Balance

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 Gut Balance real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:

- Extraktionsplattformen:

RIDA[®] Xtract

Maxwell[®] 16 (Promega)

- Real-time PCR-Gerät:

Roche: 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 I (PG0001) 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

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-Isolation aus Stuhlproben

Für die DNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Isolierungskit (z.B. RIDA[®] Xtract) oder DNA-Extraktionssystem (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 Gut Balance 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® 480II, SmartCycler® und Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
PCR 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 30.0 und für Kanal 2 und 4 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
PCR 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.

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: 5×10^2 Kopien

Standard DNA B: 5×10^4 Kopien

Standard DNA C: 5×10^6 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® 480II	<i>Bacteroides</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit I (PG0001) wird benötigt
	ICD	533/580	
	Cluster XIVa	618/660	
Cepheid SmartCycler®	<i>Bacteroides</i>	Kanal 1	Stellen Sie die „Man. Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 30.0 und für Kanal 2 und 4 auf 5.0 ein *
	ICD	Kanal 2	
	Cluster XIVa	Kanal 4	
ABI 7500	<i>Bacteroides</i>	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	
Abbott m2000rt	<i>Bacteroides</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Bacteroides</i>	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	Cluster XIVa	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Bacteroides</i>	Green	-
	ICD	Yellow	
	Cluster XIVa	Red	
Bio-Rad CFX96™	<i>Bacteroides</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	

*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/ μ l 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 QAC
NTC	Negativ * ²	Ct > 20	0

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

*² Im Falle eines positiven Signals der NTC ist ein Ct-Wert >36 als negatives Ergebnis zu werten.

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 (*Bacteroides*) auf dem LightCycler® 480II

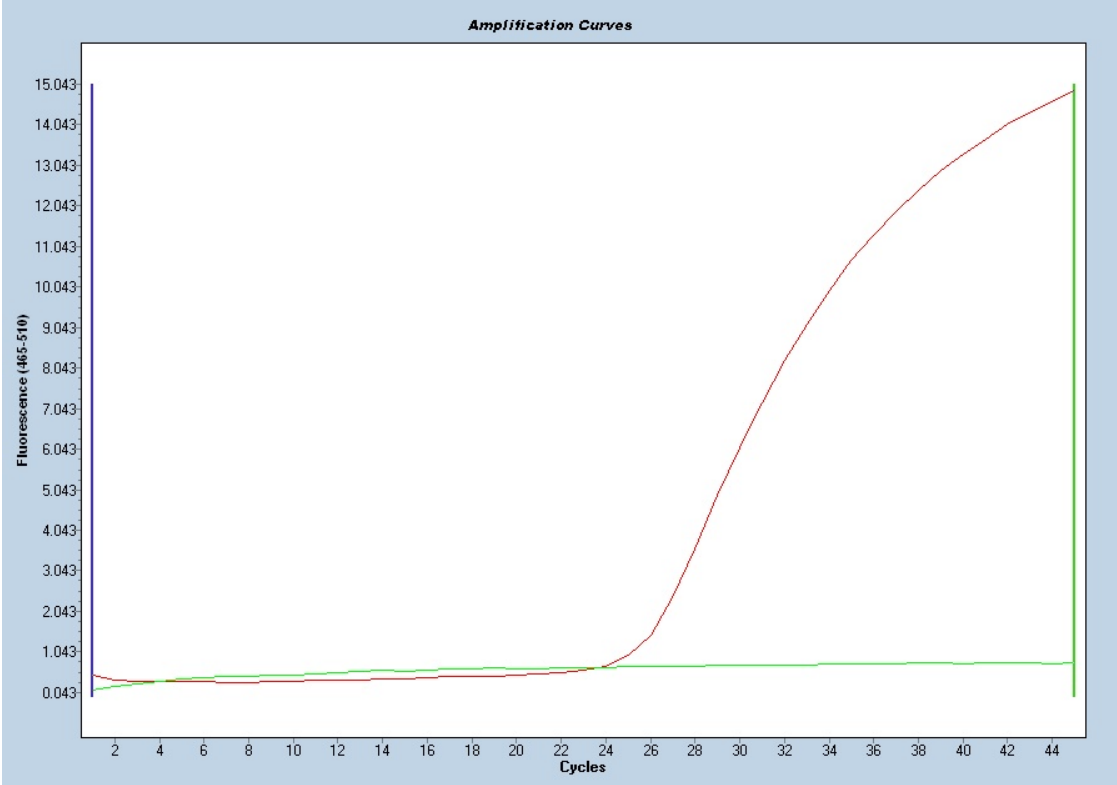
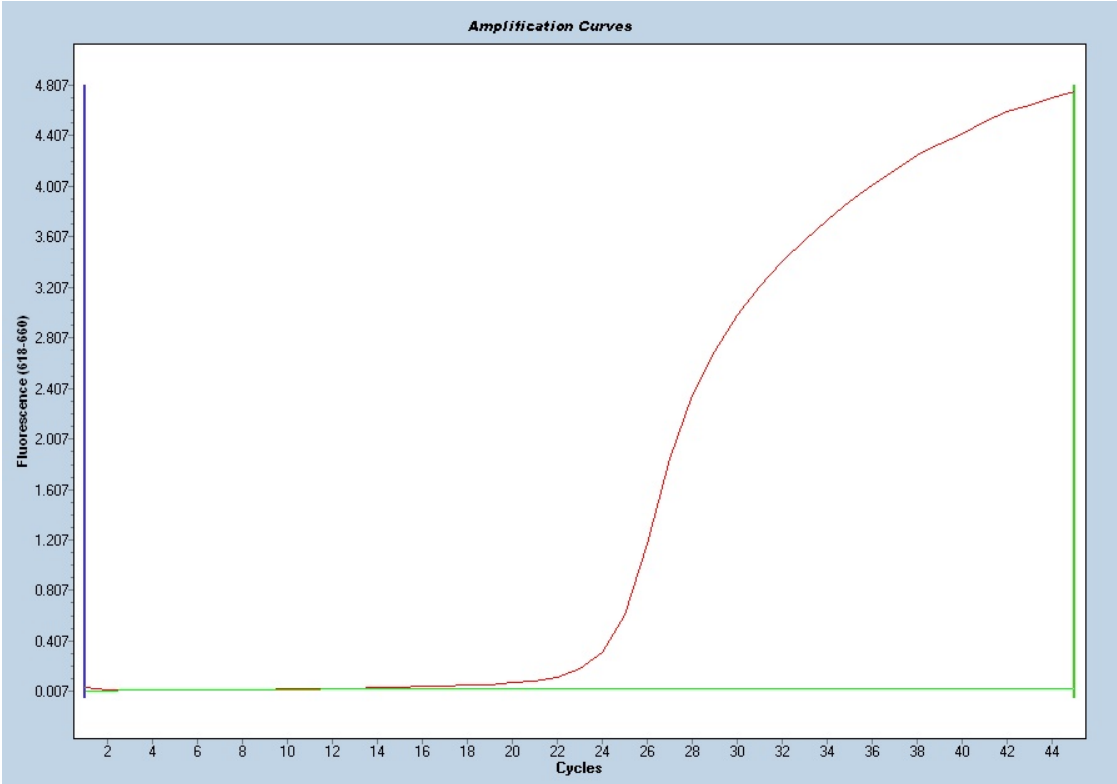


Abb.2: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (Cluster XIVa) auf dem LightCycler® 480II



11. Auswertung und Interpretation

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 8.

Tab. 8: Interpretation der Ergebnisse

Bacteroides	Cluster XIVa	ICD	Ergebnis
positiv	positiv	positiv/negativ	Bacteroides u. Cluster IXVa nachweisbar
negativ*	negativ*	positiv	Zielgene sind nicht nachweisbar *
negativ	negativ	negativ	Ungültig

Bacteroides und Cluster XIVa sind nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA (ICD) eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

Bacteroides und Cluster XIVa sind 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.

Bacteroides und Cluster XIVa sind 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 doppelt-negatives Ergebnis für Bacteroides und Cluster XIVa DNA ist unwahrscheinlich, da beide Bakteriengruppen Teile zur humanen Normalflora gehören. Bei einem doppelt-negativen Ergebnis für Bacteroides und Cluster XIVa DNA ist es wahrscheinlich, dass, bei Verwendung der ICD als Inhibitionskontrolle, die Probenextraktion nicht erfolgreich durchgeführt wurde. Bei einem doppelt-negativen Ergebnis für Bacteroides und Cluster XIVa DNA wird empfohlen die Isolierung und Reinigung der Probe zu verbessern und die Amplifikation zu wiederholen.*

11.1 Quantifizierung der Proben

Um *Bacteroides* und Cluster XIVa-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, geschlossenes System), 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 *Bacteroides* und Cluster XIVa 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 pcr@r-biopharm.de

Mit der quantitativen RIDA®GENE Gut Balance real-time multiplex 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 Gut Balance real-time multiplex 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 6x im gesamten Bacteroides-Genom enthalten oder	x 1/6 (Bacteroides)
b. Zielsequenz 5x im gesamten Cluster XIVa-Genom enthalten	x 1/5 (Cluster XIVa)
Korrekturfaktor (K) für Bacteroides**	0,3 x 10²
Korrekturfaktor (K) für Cluster XIVa**	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 6x im gesamten Bacteroides-Genom enthalten oder	x 1/6 (Bacteroides)
b. Zielsequenz 5x im gesamten Cluster XIVa-Genom enthalten	x 1/5 (Cluster XIVa)
Korrekturfaktor (K) für Bacteroides*	0,33 x 10²
Korrekturfaktor (K) für Cluster XIVa*	0,34 x 10²

* Ergebnis soll auf 1 g Stuhl bezogen sein

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

12. Grenzen des Verfahrens

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 Gut Balance 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 Gut Balance Test die Zielgene für *Bacteroides* und Cluster XIVa (16s-rRNA) detektiert.

13. Testmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®] GENE Gut Balance real-time multiplex PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA-Kopien/Reaktion für *Bacteroides* und Cluster XIVa (s. Abb. 3, Abb. 4).

Abb. 3: Standardreihe *Bacteroides* ($10^6 - 10^2$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

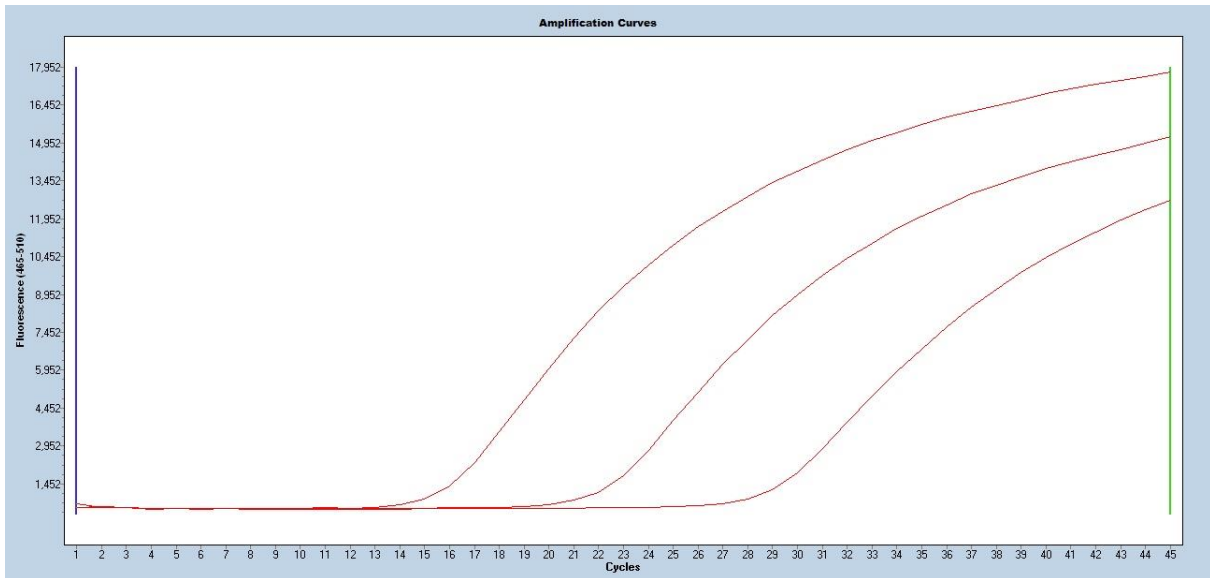
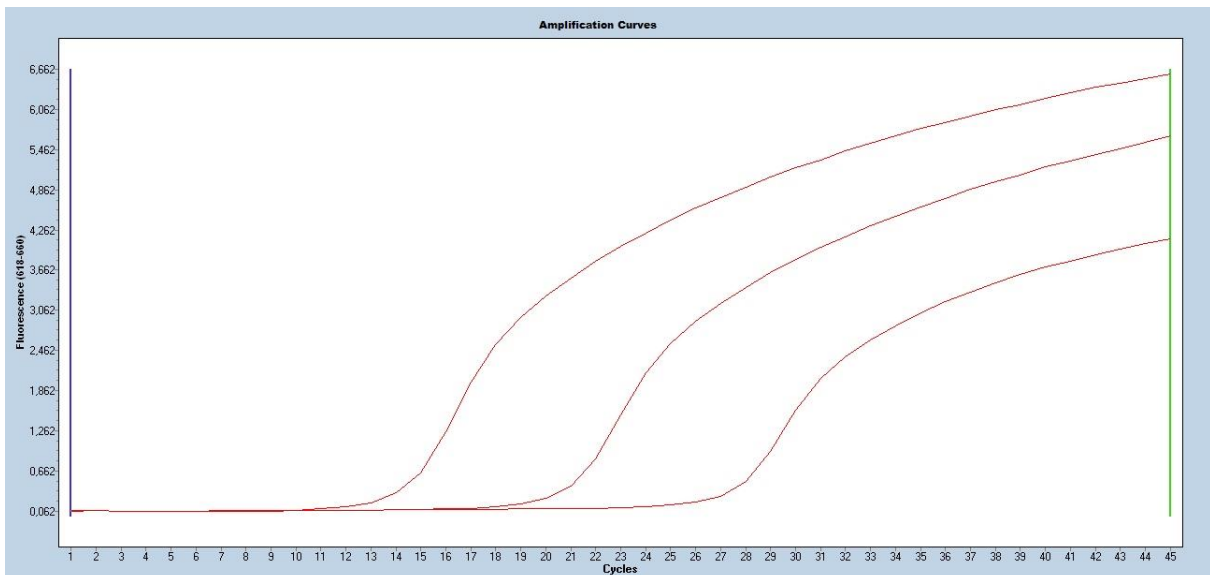


Abb. 4: Standardreihe Cluster XIVa ($10^6 - 10^2$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II



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










13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA[®] GENE Gut Balance real-time multiplex PCR ist spezifisch für *Bacteroides* und Cluster XIVa 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. 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.

RIDA[®]GENE Gut Balance

real-time PCR

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA[®]GENE Gut Balance is a real-time PCR for the direct qualitative and quantitative detection of *Bacteroides*- and Cluster XIVa DNA from human stool samples.¹

2. Summary and explanation of the test

90% of the normal human gut flora is populated by two phylogenetic groups which exist in a symbiotic balance. *Bacteroides* are anaerobic, gram-negative bacteria which are part of the normal gut flora of the intestinal tract. In the large intestine, approximately 10^{11} *Bacteroides*/g stool exist and are therefore the dominant bacteria in terms of numbers. The second phylogenetic group is the *firmicutes*. *Clostridium* Cluster XIVa are a class of *firmicutes* to which, besides others, *Eubacterium* spp. and *roseburia* spp. belong.

Different sources associate a disbalance of the composition of the gut flora (dysbiosis) with obesity.^{2,3} Here, a decreased number of *Bacteroides* corresponds to presence of obesity whereas at the same time an increasing number of *Eubacterium rectale* was detected in patients with obesity.^{3,4}

3. Test principle

RIDA[®]GENE Gut Balance is a real-time PCR for the direct, qualitative and quantitative detection *Bacteroides*- and Cluster XIVa DNA from human stool samples.

After DNA isolation, amplification of the gene fragment (if present) specific for *Bacteroides* und Cluster XIVa (16S-rRNA) occurs. The amplified targets are detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons. During the extension step, the Taq-polymerase breaks the reporter-quencher proximity. The reporter emits a fluorescent signal, which is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescence signal increases with the amount of formed amplicons. With the Standard DNA A, B and C included in the kit, it is possible to quantify the results. The RIDA[®]GENE Gut Balance real-time PCR kit contains an internal control (ICD) that

detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient.

4. Reagents provided

Tab. 1: Reagents provided (Reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations)

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2x 1100 µl	yellow
2	Taq-Polymerase	1x 11 µl	red
D	Internal Control DNA	2x 1800 µl	orange
N	PCR Water	1x 500 µl	white
P	Positive Control	1x 200 µl	blue
A	Standard DNA A	1x 100 µl	dark blue
B	Standard DNA B	1x 100 µl	dark blue
C	Standard DNA C	1x 100 µl	dark blue

5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Reagents can sustain up to 5 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all the reagents should be stored cold in an appropriate way (2 - 8 °C).

6. Additional equipment and materials required

- The RIDA[®]GENE Gut Balance real-time PCR Assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:
- Extraction platforms:
 - RIDA[®] Xtract
 - Maxwell[®] 16 (Promega)
- Real-time PCR instrument:

Roche:	LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies:	Mx3005P
Applied Biosystems:	ABI 7500
Abbott:	m2000rt
Bio-Rad:	CFX96 [™]
Cepheid:	SmartCycler [®]
QIAGEN:	Rotor-Gene Q

Note: Only use 0.1 ml tubes on the Rotor-Gene Q (QIAGEN).

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit I (PG0001) for use with the LightCycler[®] 480II
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with a rotor for the reaction vials
- Vortexer
- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

7. Precautions for users

For *in-vitro* diagnostic use.

This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed. The instruction manual for the test procedure has to be followed. Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes. During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure. Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.

All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Material Safety Data Sheets (MSDS) at www.r-biopharm.com

8. Sample collection and Storage

8.1 DNA isolation from stool samples

For DNA isolation of human stool samples, use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA[®] Xtract) or DNA extraction system (e.g. Maxwell[®] 16 (Promega)). Extract DNA according to the manufacturer's instructions.

We recommend to dilute the stool samples before extraction 1:3 with water. Vortex the diluted stool sample intensely and centrifuge at 3,000 rpm for 30 sec. From the supernatant, use the appropriate volume according to manufacturer's instructions.

To isolate DNA from bronchoalveolar lavage, we recommend using a commercially available DNA extraction system (e.g. NucliSENS easy[®] MAG[™] (bioMérieux)). Isolate DNA according to manufacturer's instructions.

The RIDA[®]GENE Gut Balance real-time PCR kit contains an Internal Control DNA (ICD) that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient.

If the **Internal Control DNA** is used as an extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control DNA** has to be added during extraction procedure. The **Internal Control DNA** should always be added to the specimen-lysis buffer mixture and must **not** be added directly to the specimen.

If the **Internal Control DNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control DNA** should be added to the Master-Mix (see Tab. 3).

9. Test procedure

9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One positive control and negative control must be included in each assay run.

We recommend calculating an additional volume of 10% to compensate imprecise pipetting (see Tab. 2, Tab. 3). Thaw, mix gently and briefly centrifuge the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, the **Positive Control**, the **PCR Water** and the **Internal Control DNA** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 - 8 °C).

Tab. 2: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix
(ICD as extraction and PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
2	Taq-Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
	Total	20.0 µl	220 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

Tab. 3: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix
(ICD only as PCR inhibition control)

Kit Code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
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
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

9.2 Preparation of the PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

Negative control: Add 5 µl PCR Water as negative control to the pre-pipetted Master-Mix.

*Note: If the ICD is used as extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the ICD to the negative control PCR-Mix.*

Sample: Add 5 µl DNA-Extract to the pre-pipetted Master-Mix.

Positive control: Add 5 µl Positive Control to the pre-pipetted Master-Mix.

*Note: If the Internal Control DNA is used as extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the Internal Control DNA to the positive control PCR-Mix.*

Standard DNA (A, B, C): Add 5 µl Standard DNA (A, B, C) to the pre-pipetted Master-Mix in the designated reaction tubes.

Note: Using the following cyclers requires to include a standard curve in each run: SmartCycler[®] (Cepheid, closed system), ABI 7500 (Applied Biosystems), m2000rt (Abbott) and CFX96[™] (Bio-Rad)

For all other cyclers, only one sample of the standard curve has to be included in the experimental set-up as calibrator for each new real-time PCR run. Here, the application of a standard curve is only required to run once per lot number.

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument. The PCR reaction should be started according to the PCR instrument Set-up (see Tab. 4, Tab. 5).

9.3 PCR Instrument Set-up

Tab. 4: Real-time PCR profile for LightCycler® 480II, SmartCycler® and Rotor-Gene Q

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
<u>Cycles</u>	45 Cycles
PCR Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Note: Check that the “Manual Thres. Fluor Units” for Channel 1 is set to 30.0 and for Channel 2 and 4 is set to 5.0 on the SmartCycler® (Cepheid). Due to variations between different cyclers, it may be required to individually adapt the “Manual Thres. Fluor Units” for channel 1.

Tab. 5: Real-time PCR profile for Mx3005P, ABI 7500, m2000rt and CFX96™

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
<u>Cycles</u>	45 Cycles
PCR Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Note: The total copy number per reaction of Standard DNA A, B and C has to be typed in into the Setup File of the software programme of the respective real-time PCR cycler. A total volume of 5 µl DNA is used resulting in following concentrations:

Standard DNA A: 5×10^1 copies/reaction

Standard DNA B: 5×10^3 copies/reaction

Standard DNA C: 5×10^5 copies/reaction

Note: *The standard curve can be saved on the real-time PCR cycler for each parameter. Apart from the SmartCycler® (Cepheid, closed system), the ABI 7500 (Applied Biosystems), the m2000rt (Abbott) and the CFX96™ (Bio-Rad) cycler, the standard curve is only required to run once per lot number. Using the SmartCycler® (Cepheid, closed system), the ABI 7500 (Applied Biosystems), the m2000rt (Abbott) and the CFX96™ (Bio-Rad) cycler requires to include a standard curve in each run. For all other cyclers, only one sample of the standard curve has to be included in the experimental set-up as calibrator for each new real-time PCR run.*

9.4 Detection channel Set-up

Tab. 6: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR Instrument	Detection	Detection Channel	Note
Roche LightCycler® 480II	<i>Bacteroides</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit I (PG0001) is required
	ICD	533/580	
	Cluster XIVa	618/660	
Cepheid SmartCycler®	<i>Bacteroides</i>	Kanal 1	Check that the “Manual Thres. Fluor Units” for Channel 1 is set to 30.0 and for Channel 2 and 4 is set to 5.0*
	ICD	Kanal 2	
	Cluster XIVa	Kanal 4	
ABI 7500	<i>Bacteroides</i>	FAM	Check that passive reference option ROX is none
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	
Abbott m2000rt	<i>Bacteroides</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Bacteroides</i>	FAM	Check that reference dye is none
	ICD	HEX	
	Cluster XIVa	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Bacteroides</i>	Green	The gain settings have to be set to 5
	ICD	Yellow	
	Cluster XIVa	Red	
Bio-Rad CFX96™	<i>Bacteroides</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	

* Due to variations between different cyclers, it may be required to individually adapt the Manual Thres. Fluor Units” for channel 1.

10. Quality Control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer`s instructions. Positive and negative controls have to show correct results (see Table 7, Fig. 1) in order to determine a VALID run.

The positive control has a concentration of 10^3 copies/ μ l. In each PCR run it is used in a total amount of 5×10^3 copies.

Tab. 7: For a VALID run, the following conditions must be met:

Sample	Assay result	ICD Ct	Target Ct
PTC	Positive	NA * ¹	See QAC
NTC	Negative * ²	Ct > 20	0

*¹ No Ct value is required for the ICR to make a positive call for the positive control.

*² In case of a positive amplification signal of the NTC, a Ct value >36 is rated as negative.

If the Positive Control (PTC) is not positive within the specified Ct range but the Negative Control is valid, prepare all new reactions using remaining purified nucleic acids and a new Positive Control.

If the Negative Control (NTC) is not negative but the Positive control is valid prepare all new reactions using remaining purified nucleic acids and a new Negative Control.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer`s instructions. Positive and negative controls have to show correct results (see Fig. 1).

Fig. 1: Correct run of the positive and negative control (*Bacteroides*) on the LightCycler® 480II

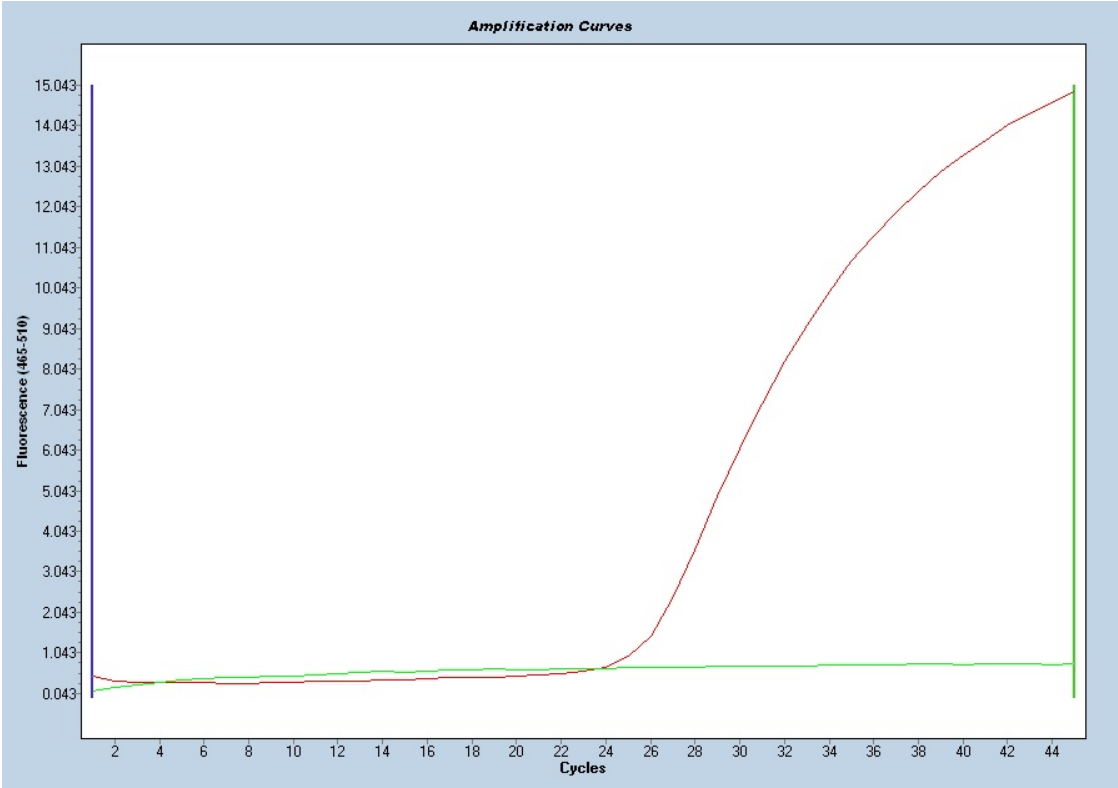
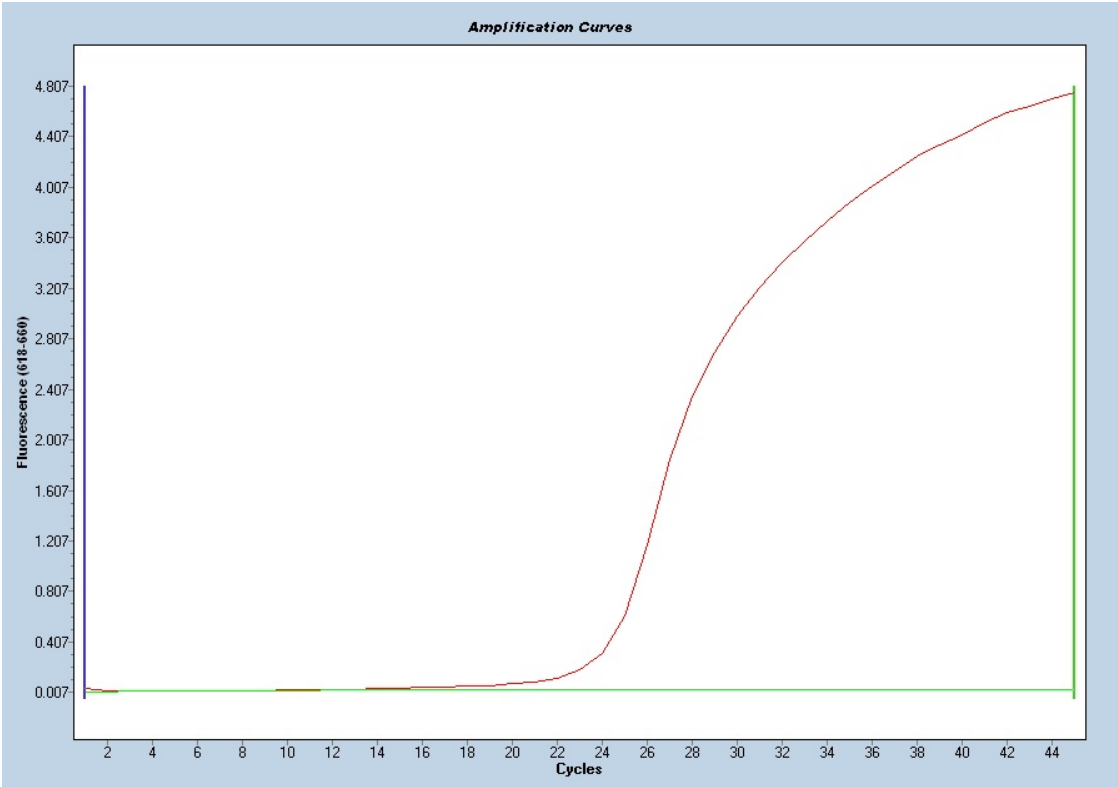


Fig. 2: Correct run of the positive and negative control (Cluster XIVa) on the LightCycler® 480II



11. Evaluation and interpretation

The result interpretation is done according to Table 8.

Tab. 8: Sample interpretation

Bacteroides	Cluster XIVa	ICD	Ergebnis
positive	positive	positive/negative	Bacteroides & Cluster IXVa detected
negative*	negative*	positive	Target genes are not detected*
negative	negative	negative	Invalid

Bacteroides and Cluster XIVa is detected, if the sample DNA and the Internal Control DNA (ICD) show an amplification signal in the detection system.

Bacteroides and Cluster XIVa is also detected, if the sample DNA shows an amplification signal but none for the Internal Control DNA (ICD) in the detection system. The detection of the internal amplification control is not necessary, because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the Internal Control DNA (ICD).

Bacteroides and Cluster XIVa is not detected, if the sample DNA shows no amplification signal, but an amplification signal for the Internal Control DNA (ICD) in the detection system. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the detection of the Internal Control DNA (ICD).

A sample is invalid, if the sample DNA and Internal Control DNA (ICD) show no amplification signal in the detection system. The sample contains a PCR inhibitor. The extracted sample needs to be further diluted with PCR water (1:10) and re-amplified, or the isolation and purification of the sample has to be improved.

*** Note:** *A double-negative result for Bacteroides and Cluster XIVa DNA is unlikely since both bacterial groups are human commensal bacteria. If a double-negative result occurs for Bacteroides and Cluster XIVa DNA, it is likely that, upon use of the ICD as inhibition control, the sample extraction was not successful. If a double-negative result occurs for Bacteroides and Cluster XIVa DNA, it is recommended to improve isolation and purification of the sample and repeat amplification of the sample.*

11.1 Quantification of samples

To quantify *Bacteroides* and *Cluster XIVa*-positive samples, a standard curve with the Standard DNA A, B and C has to be performed separately. The standard curve measurement has to be saved separately. However, the same standard curve measurement can be used in all runs with products from the same lot number by importing the saved experiment.

Note: *This is not valid for the following cyclers: SmartCycler® (Cepheid, closed system), ABI 7500 (Applied Biosystems), m2000rt (Abbott) and CFX96™ (Bio-Rad). Here, a standard curve has to be measured with each run.*

For all other cyclers, one sample of the standard curve has to be included in the experimental set-up as calibrator for each new real-time PCR run.

To quantify *Bacteroides* and *Cluster XIVa*-positive samples, all Standard DNA samples (A, B and C), the positive and negative control as well as the unknown samples to be quantified, have to be selected and analyzed according to the instructions of the cycler manufacturer.

Note: *For further information on quantification of please contact pcr@r-biopharm.de*

With the quantitative RIDA®GENE Gut Balance real-time PCR the amount of DNA in Copies/Reaction of the parameter is calculated. The conversion in cell concentration/g stool sample is done with a correction factor K and takes into account the dilution of the extraction procedure (dependent on the extraction kit used) and the PCR Set-up as well as the number of target sequences in the whole genome.

The conversion of the result of the quantitative RIDA®GENE Gut balance real-time PCR in cells/g stool is calculated with following formula:

$$C \text{ [cells/g stool]} = c \text{ [copies/reaction]} \times K$$

C [cells/g stool]	- bacterial concentration of sample in cells/g stool
c [copies/reaction]	- DNA concentration in PCR reaction (result of quantitative PCR)
K	- correction factor

For the calculation of the correction factor, following information has to be considered:

- Sample dilution
- Starting volume of sample for DNA extraction
- Usage of partial sample during extraction
- DNA extract from total eluate used for PCR reaction
- Number of target sequence in the whole genome

Tab. 9: Example calculation of correction factor using RIDA[®] Xtract for sample preparation of a 1:3 diluted sample

Description	Factor
Sample dilution 1:3 before extraction	x 3
200 µl sample for extraction*	x 5
5 µl DNA extract into PCR reaction (total eluate 60 µl (= 1/12))	x 12
a. Target sequence contained 6x in total Bacteroides-genome or	x 1/6 (Bacteroides)
b. Target sequence contained 5x in total Cluster XIVa-genome	x 1/5 (Cluster XIVa)
Correction factor (K) for Bacteroides**	0.3 x 10²
Correction factor (K) for Cluster XIVa**	0.36 x 10²

* Result corresponds to 1 g stool

** This value can be saved in the real-time PCR instrument

Tab. 10: Example calculation of correction factor using Maxwell 16[®] LEV Blood DNA Kit AS1290 (Promega) for sample preparation of a 1:3 diluted sample

Description	Factor
Sample dilution 1:3 before extraction	x 3
300 µl sample for extraction*	x 3,33
5 µl DNA extract into PCR reaction (total eluate 100 µl (= 1/20))	x 20
a. Target sequence contained 6x in total Bacteroides-genome or	x 1/6 (Bacteroides)
b. Target sequence contained 5x in total Cluster XIVa-genome	x 1/5 (Cluster XIVa)
Correction factor (K) for Bacteroides**	0.33 x 10²
Correction factor (K) for Cluster XIVa**	0.40 x 10²

* Result corresponds to 1 g stool

** This value can be saved in the real-time PCR instrument

12. Limitations of the method

1. The result of molecular analysis should not lead to the diagnosis, but always be considered in the context of medical history and symptoms of the patient.
2. This assay is only validated for human stool samples.
3. Inappropriate specimen collection, transport, storage and processing or a pathogen load in the specimen below the analytical sensitivity can result in false negative results.
4. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
5. Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new variants resulting in a false negative result with the RIDA[®] GENE Gut Balance assay.
6. As with all PCR based *in vitro* diagnostic tests, extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of the target genes for *Bacteroides* und Cluster XIVa (16s-rRNA).

13. Performance characteristics

13.1 Analytical sensitivity

The RIDA[®] GENE Gut Balance real-time PCR has a limit of detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for *Bacteroides* and Cluster XIVa (s. Fig. 3).

Fig. 3: Dilution series *Bacteroides* ($10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

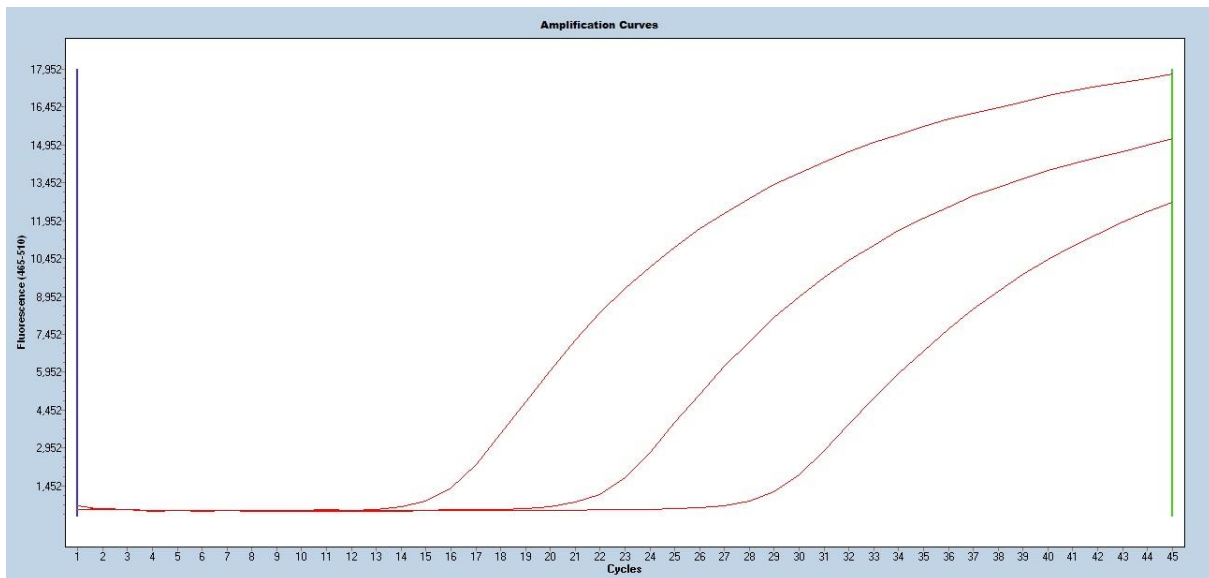
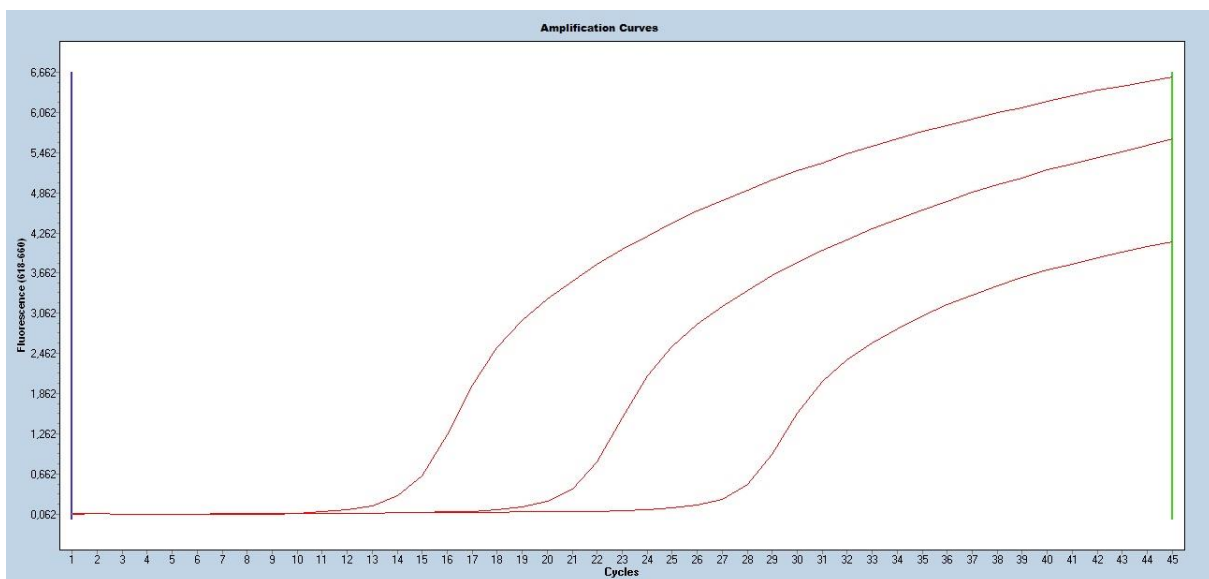


Fig. 4: Dilution series Cluster XIVa ($10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II



The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, DNA extraction and DNA concentration.










13.2 Analytical specificity

The RIDA[®] GENE Gut Balance real-time PCR is specific for *Bacteroides* and Cluster XIVa. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab. 11):

Tab. 11: Cross-reactivity testing

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>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<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>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. Fetus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. Lari	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<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	-				

Explanation of Symbols

	For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of test
	Date of manufacture
	Manufacturer

Literature

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 faecal 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.