

RIDA® GENE Faecalibacterium prausnitzii

REF PG0155



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



Deutsch	3
English.....	23
Español.....	41
Français.....	61
Italiano	81

RIDA® GENE Faecalibacterium prausnitzii

REF PG0155

1. Zweckbestimmung

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

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

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

3. Testprinzip

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

Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von *Faecalibacterium prausnitzii* (16S-rRNA) amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplifikaten. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplifikate an. Mit Hilfe der im Kit enthaltenen Standards Standard A, Standard B und Standard C, ist eine Quantifizierung der Ergebnisse möglich. Der ermittelte DNA-Gehalt der Probe (Kopien/Reaktionsansatz) wird mit Hilfe eines Korrekturfaktors (K, siehe auch Tab. 12) in die Konzentrationseinheit Zellen/g Stuhl umgerechnet. Der RIDA[®]GENE *Faecalibacterium prausnitzii* Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau
10 ²	Standard A	1x	100 µl	dunkelblau
10 ⁴	Standard B	1x	100 µl	dunkelblau
10 ⁶	Standard C	1x	100 µl	dunkelblau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu **20 Mal** beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA® GENE Faecalibacterium prausnitzii multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab. 2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler® 2.0
- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA-Präparation aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:3 mit Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 30 sec bei 1000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®]GENE Faecalibacterium prausnitzii Test enthält eine Internal Control DNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control DNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control DNA je Reaktion dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control DNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control DNA je Probe während der Extraktion eingesetzt werden. Die Internal Control DNA soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl pro Reaktion der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, die **No Template Control**, die **Internal Control DNA**, **Standard A**, **Standard B** und **Standard C** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

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

Negativkontrolle: 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

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

Proben: 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

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

Standard (A, B, C): 5 µl **Standard** (A, B, C) zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

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

Hinweis: Bei der Nutzung folgender Geräte muss bei jedem Lauf eine Standardkurve integriert werden: ABI 7500 (Applied Biosystems) und CFX96™ (Bio-Rad).

Für alle anderen Geräte kann eine Standardkurve exportiert und importiert werden. Folglich muss bei jedem neuen Lauf nur ein Punkt der Standardkurve (**Standard B**) als Kalibrator in das Experiment integriert werden. Die Applikation der Standardkurve ist für diese Geräte nur einmal pro Charge notwendig.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab.7, Tab.8).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 DNA real-time PCR Profil

Tab. 5: DNA real-time PCR Profil für LightCycler® Serie und Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

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

Tab. 6: DNA real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500 und CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

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

Hinweis: Bei einer quantitativen Auswertung ist für **Standard A**, **Standard B** und **Standard C** die Gesamtkopienanzahl je Reaktion in das Setup File des Softwareprogramms des jeweiligen real-time PCR-Gerätes einzutragen. Es werden 5 µl DNA eingesetzt, so dass sich folgende Konzentrationen ergeben:

Standard A: 5×10^2 Kopien/Ansatz

Standard B: 5×10^4 Kopien/Ansatz

Standard C: 5×10^6 Kopien/Ansatz

Hinweis: Die Standardkurve kann für jeden Parameter auf dem real-time PCR-Gerät abgespeichert werden. Ausgenommen von dem ABI 7500 (Applied Biosystems) und dem CFX96™ (Bio-Rad) ist die Applikation der Standardkurve nur einmal pro Charge notwendig. Bei der Nutzung des ABI 7500 (Applied Biosystems) und des CFX96™ (Bio-Rad) muss bei jedem Lauf eine Standardkurve integriert werden. Für alle anderen Geräte muss bei jedem neuen Lauf nur ein Punkt der Standardkurve (**Standard B**) als Kalibrator in das Experiment integriert werden.

9.3.2 Universal real-time PCR-Profil

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

Tab. 7: Universal real-time PCR Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

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

Tab. 8: Universal real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

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

Hinweis: Bei einer quantitativen Auswertung ist für **Standard A**, **Standard B** und **Standard C** die Gesamtkopienanzahl je Reaktion in das Setup File des Softwareprogramms des jeweiligen real-time PCR-Gerätes einzutragen. Es werden 5 µl DNA eingesetzt, so dass sich folgende Konzentrationen ergeben:

Standard A: 5 x 10² Kopien/Ansatz

Standard B: 5 x 10⁴ Kopien/Ansatz

Standard C: 5 x 10⁶ Kopien/Ansatz

Hinweis: Die Standardkurve kann für jeden Parameter auf dem real-time PCR-Gerät abgespeichert werden. Ausgenommen von dem ABI 7500 (Applied Biosystems) und dem CFX96™ (Bio-Rad) ist die Applikation der Standardkurve nur einmal pro Charge notwendig. Bei der Nutzung des ABI 7500 (Applied Biosystems) und des CFX96™ (Bio-Rad) muss bei jedem Lauf eine Standardkurve integriert werden. Für alle anderen Geräte muss bei jedem neuen Lauf nur ein Punkt der Standardkurve (**Standard B**) als Kalibrator in das Experiment integriert werden.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

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

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

Tab. 10: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	Nicht nachweisbar

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

Wenn die Positivkontrolle nicht in dem angegebenen Ct-Bereich liegt, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

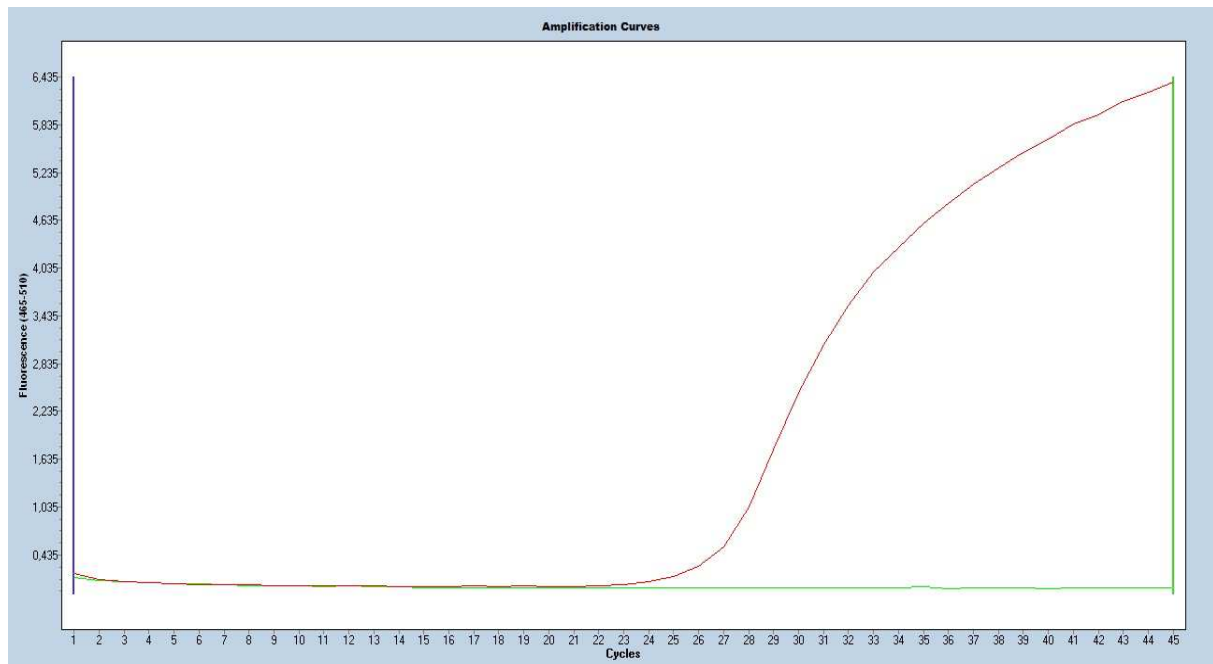


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Faecalibacterium prausnitzii*) auf dem LightCycler® 480II

10.1 Gültigkeit bei quantitativem Nachweis

Damit die Gültigkeit eines quantitativen PCR-Laufes gegeben ist, müssen alle Kontrollbedingungen eines gültigen qualitativen diagnostischen PCR-Laufes erfüllt sein. Für korrekte Quantifizierungsergebnisse muss zusätzlich eine gültige Standardkurve erstellt werden. Es müssen folgende Werte der Kontrollparameter einer Standardkurve erreicht werden:

	Kontrollparameter	Gültiger Wert
Roche LightCycler® 2.0	Efficiency	1,9 – 2,1
	Slope	-3,1 – -3,6
Roche LightCycler® 480II	Efficiency	1,9 – 2,1
	Slope	-3,1 – -3,6
Agilent Techn. Mx3005P	Rsq	> 0,98
	Slope	-3,1 – -3,6
ABI 7500	R ²	> 0,98
	Slope	-3,1 – -3,6
Bio-Rad CFX96™	R ²	> 0,98
	Slope	-3,1 - -3,6
Qiagen Rotor-Gene Q	R ²	> 0,98
	M	3,1 – -3,6

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

Tab. 11: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von		
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ICD	Ergebnis
positiv	positiv/ negativ	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> nachweisbar
negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar*
negativ	negativ	Ungültig

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

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

Faecalibacterium prausnitzii ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control DNA** jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control DNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

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

11.1 Quantifizierung der Proben

Um *Faecalibacterium prausnitzii*-positive Proben zu quantifizieren, muss eine Standardkurvenmessung mit **Standard A**, **Standard B** und **Standard C** durchgeführt werden. Diese muss separat abgespeichert werden und kann in Folgeläufen bei Produkten der gleichen Chargennummer wieder importiert und genutzt werden.

Hinweis: Dies gilt nicht für folgende Geräte: ABI 7500 (Applied Biosystems) und CFX96™ (Bio-Rad). Hier muss bei jedem Lauf eine Standardkurve integriert werden. Für alle anderen Geräte ist es bei jedem neuen Lauf erforderlich, dass ein Punkt der Standardkurve (Standard B) als Kalibrator in das Experiment integriert wird.

Für die Quantifizierung der Proben, bei denen *Faecalibacterium prausnitzii* nachweisbar ist, werden die Reaktionen für die Standards (A, B und C), die Positivkontrolle und Negativkontrolle sowie die zu quantifizierenden Proben markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Ein korrektes Quantifizierungsergebnis ist nur zuverlässig möglich, wenn die Ct-Werte des *Faecalibacterium prausnitzii*-spezifischen Zielgens (16S-rRNA) im Ct-Bereich der Standards gemessen werden.

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

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

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

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

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

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

Tab. 12: Beispiel-Berechnung des Korrekturfaktors K bei einer Probenaufbereitung mit dem Maxwell[®] RSC (Promega) (bei Verwendung einer 1:3 verdünnten Probe)

Beschreibung	Faktor
Probenverdünnung 1:3 vor der Extraktion	x 3
300 µl Probeneinsatz in die Extraktion*	x 3,33
5 µl DNA-Extrakt-Einsatz in PCR**	x 20
Zielsequenz ist 5x im gesamten <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> -Genom enthalten	x 0,2 (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)
Korrekturfaktor K für <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ***	0,40 x 10²

* Ergebnis soll auf 1 g Stuhl bezogen sein

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

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

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

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Stuhlproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA[®] GENE *Faecalibacterium prausnitzii* zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (16S-rRNA) vorhanden sind.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Der RIDA[®] GENE Faecalibacterium prausnitzii multiplex real-time PCR Test hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA Kopien/Reaktion für *Faecalibacterium prausnitzii*.

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

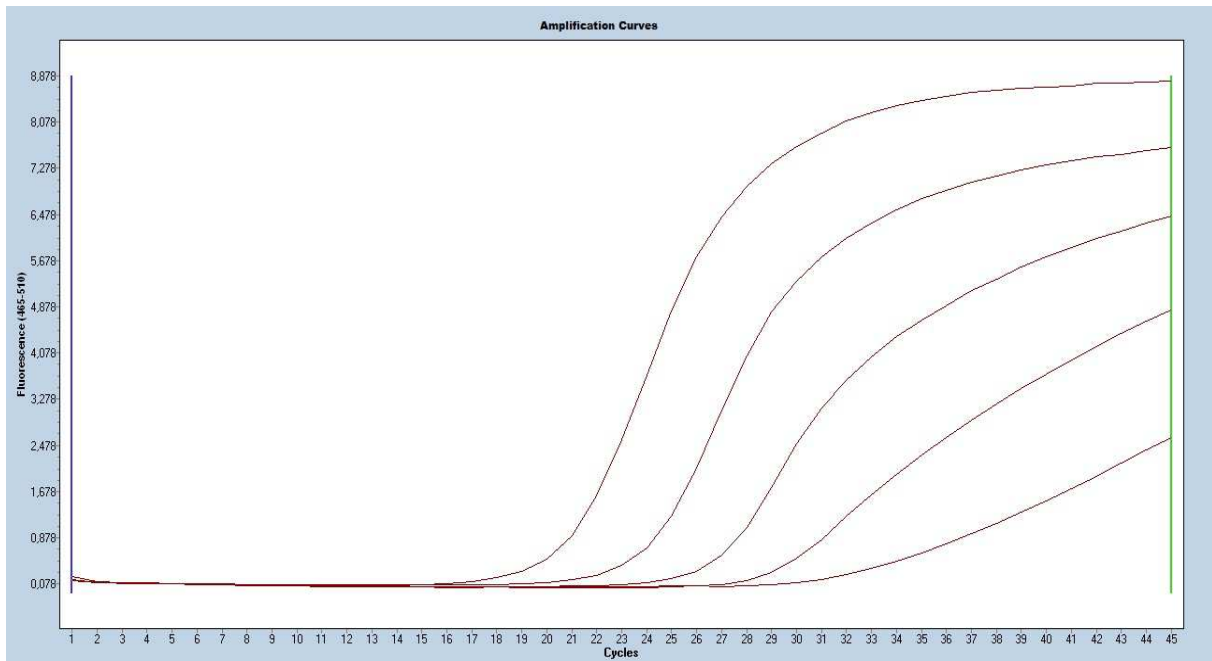


Abb. 2: Verdünnungsreihe *Faecalibacterium prausnitzii* ($10^6 - 10^2$ DNA Kopien/ μl) auf dem LightCycler[®] 480II

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

13.2 Analytische Spezifität

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

Tab. 13: Kreuzreaktivitätstestung










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

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-07-01	Generelle Überarbeitung 3. Testprinzip 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 7. Vorsichtsmaßnahmen 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 11. Interpretation der Ergebnisse 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

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

English

RIDA[®] GENE Faecalibacterium prausnitzii

REF PG0155

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA[®]GENE Faecalibacterium prausnitzii is a multiplex real-time PCR for the direct qualitative and quantitative detection of *Faecalibacterium prausnitzii* DNA in human stool samples.

2. Summary and explanation of the test

Faecalibacterium prausnitzii is a gram-positive, strictly anaerobic, commensal bacterium and belongs to the family of *Clostridiaceae*. *F. prausnitzii* is one of the most important bacteria in the human gut flora and makes up to 5 - 10 % of the total number of bacteria detected in stool samples from healthy humans.¹ *F. prausnitzii* localization seemed to depend upon anaerobic conditions only found in the lower gut.² In early infancy the number of *F. prausnitzii* is very low and increases after the establishment of primocolonizing bacteria.² They are strictly anaerobic and thus difficult to grow in culture. Consequently, this explains why the mechanisms of its protection potential are still poorly understood. *F. prausnitzii* produces butyric acid derivatives e.g. butyrate, which are essential for the intestinal activity. Butyrates play an important role for the metabolism in the colon. They serve as energy sources for the colonocytes and have anti-inflammatory effects and maintain the activity of bacterial enzymes and protect the digestive system against intestinal pathogens.³ Changes in the number of *F. prausnitzii* are an indication for dysbiosis in the human gut flora. A significant reduction of *F. prausnitzii* is detected by patients with diabetes and chronic inflammatory intestinal disorders (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Irritable Bowel Syndrome [IBS]). For the latter case, the intestinal barrier is disrupted or rather the intestinal wall gets more permeable. This leads to an unregulated mass exchange and causes diarrheal diseases and inflammatory reactions.

3. Test principle

RIDA[®]GENE *Faecalibacterium prausnitzii* is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative and quantitative detection of *Faecalibacterium prausnitzii* in human stool samples.

After DNA isolation, amplification of the gene fragment (if present) specific for *Faecalibacterium prausnitzii* (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 standards, Standard A, Standard B and Standard C, included in the kit, it is possible to quantify the results. The identified DNA amount in the sample (copies/reaction) is converted into the concentration unit cells / g stool with a correction factor (K, see also table 12). The RIDA[®]GENE *Faecalibacterium prausnitzii* multiplex 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.

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	1050 µl	yellow
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	red
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	white
P	Positive Control	1x	200 µl	blue
10 [^] 2	Standard A	1x	100 µl	dark blue
10 [^] 4	Standard B	1x	100 µl	dark blue
10 [^] 6	Standard C	1x	100 µl	dark blue

5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used unopened 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 **20 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 necessary reagents and necessary equipment

The RIDA[®]GENE Faecalibacterium prausnitzii multiplex real-time PCR assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

Tab. 2: Necessary equipment

Extraction platform	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Real-time PCR instrument:	
Roche	LightCycler [®] 2.0, LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
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 II (PG0002) for use with the LightCycler[®] 2.0
- **RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) 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
- **PCR water (nuclease-free)**

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 Safety Data Sheets (SDS) at www.r-biopharm.com

8. Collection and storage of samples

8.1 Sample preparation from stool samples

For DNA isolation of human stool samples, use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) or DNA extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC (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 1000 x g for 30 sec. Use from the supernatant the appropriate volume according to the manufacturer's instruction.

The RIDA[®]GENE Faecalibacterium prausnitzii assay contains an **Internal Control DNA** that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The **Internal Control DNA** can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

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.4).

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. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the negative control and positive control PCR Mix.

9. Test procedure

9.1 Master-Mix preparation

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

We recommend to calculate an additional volume of 10 % to compensate imprecise pipetting (see Tab. 3, Tab. 4). Thaw, mix gently and centrifuge briefly the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, the **Positive Control**, the **No Template Control**, the **Internal Control DNA** and **Standard A**, **Standard B** and **Standard C** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 - 8 °C).

Tab. 3: 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	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

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

Tab. 4: 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	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 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 **No Template 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 PCR-Mix of the negative control.

Sample: Add 5 µl eluate 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 PCR-Mix of the positive control.

Standard (A, B, C): Add 5 µl **Standard** (A, B, C) 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 PCR-Mix of the standards.

Note: Using the following cyclers requires to include a standard curve in each run: ABI 7500 (Applied Biosystems) and CFX96™ (Bio-Rad).

For all other cyclers, only one sample of the standard curve (Standard B**) 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. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 DNA real-time PCR profile

Tab. 5: DNA real-time PCR profile for LightCycler® series and Rotor-Gene Q

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	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.

Tab. 6: DNA real-time PCR profile for Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	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 A**, **Standard B** and **Standard C** has to be typed in into the Setup File of the software program of the respective real-time PCR cycler. A total volume of 5 µl DNA is used resulting in following concentrations:

Standard A: 5 x 10² copies/reaction

Standard B: 5 x 10⁴ copies/reaction

Standard C: 5 x 10⁶ copies/reaction

Note: The standard curve can be saved on the real-time PCR cycler for each parameter. Apart from the ABI 7500 (Applied Biosystems) and the CFX96™ (Bio-Rad) cycler, the standard curve is only required to run once per lot number. Using the ABI 7500 (Applied Biosystems) 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 (**Standard B**) has to be included in the experimental set-up as calibrator for each new real-time PCR run.

9.3.2 Universal real-time PCR profile

Note: The universal real-time PCR profile should only be used for DNA assays when combining RIDA[®]GENE DNA and RNA real-time PCR assays in one run.

Tab. 7: Universal real-time PCR profile for LightCycler[®] series

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> 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.

Tab. 8: Universal real-time PCR profile for Mx3005P, ABI7500, CFX96[™] and Rotor-Gene Q

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> 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 A**, **Standard B** and **Standard C** has to be typed in into the Setup File of the software program of the respective real-time PCR cycler. A total volume of 5 µl DNA is used resulting in following concentrations:

Standard A: 5 x 10² copies/reaction

Standard B: 5 x 10⁴ copies/reaction

Standard C: 5 x 10⁶ copies/reaction

Note: The standard curve can be saved on the real-time PCR cycler for each parameter. Apart from the ABI 7500 (Applied Biosystems) and the CFX96[™] (Bio-Rad) cycler, the standard curve is only required to run once per lot number. Using the ABI 7500 (Applied Biosystems) 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 (**Standard B**) 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. 9: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection channel	Note
Roche LightCycler® 2.0	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) is required
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICD	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	Check that reference dye is none
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	Check that passive reference option ROX is none
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Green	The gain settings have to be set to 5, according to the default settings
	ICD	Yellow	

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 control and negative control have to show correct results (see Table 10, 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. 10: For a valid run, the following conditions must be met:

Sample	Assay result	ICD Ct	Target Ct
Positive control	Positive	NA ^{*1}	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	Not detectable

^{*1} No Ct value is required for the ICD to make a positive call for the positive control.

If the positive control is not positive within the specified Ct range but the negative control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the negative control is not negative but the positive control is valid, prepare all new reactions including the controls.

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

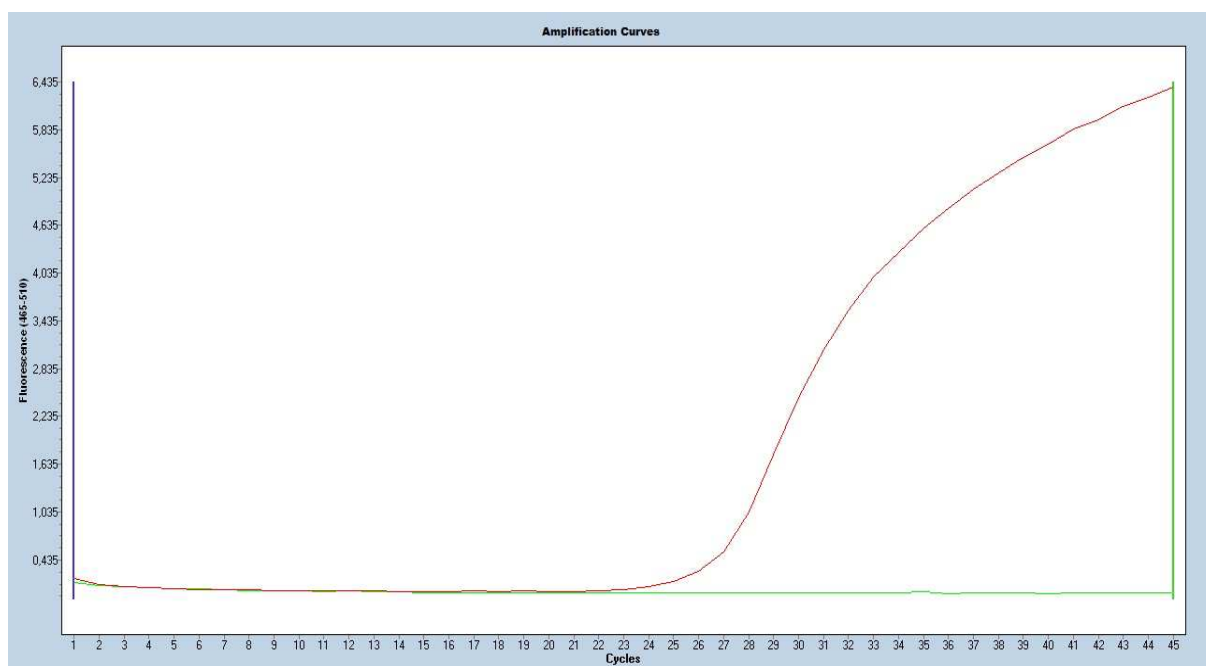


Fig. 1: Correct run of the positive control (red) and negative control (green) (*Faecalibacterium prausnitzii*) on the LightCycler® 480II

10.1 Validity of quantitative detection

For the validity of a quantitative diagnostic test run, all control conditions of a valid qualitative diagnostic test run must be met. Furthermore, for accurate quantification results a valid standard curve has to be generated. For a valid quantitative diagnostic test run, the following control parameter values of the standard curve should be achieved.

	Control parameter	Valid value
Roche LightCycler® 2.0	Efficiency	1,9 – 2,1
	Efficiency	1,9 – 2,1
Roche LightCycler® 480II	Slope	-3,1 – -3,6
	Slope	-3,1 – -3,6
Agilent Techn. Mx3005P	Rsq	> 0,98
	Slope	-3,1 – -3,6
ABI 7500	R ²	> 0,98
	Slope	-3,1 – -3,6
Bio-Rad CFX96™	R ²	> 0,98
	Slope	-3,1 - -3,6
Qiagen Rotor-Gene Q	R ²	> 0,98
	M	3,1 – -3,6

11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Table 11.

Tab. 11: Sample interpretation

Target genes		
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ICD	Result
positive	positive / negative	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> detected
negative*	positive	Target genes not detected*
negative	negative	Invalid

Faecalibacterium prausnitzii is detected, if the sample DNA and the Internal Control DNA show an amplification signal in the detection system.

Faecalibacterium prausnitzii is also detected, if the sample DNA shows an amplification signal but none for the Internal Control DNA 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.

Faecalibacterium prausnitzii is not detected, if the sample DNA shows no amplification signal, but an amplification signal for Internal Control DNA in the detection system. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the detection of the Internal Control DNA.

A sample is invalid, if the sample DNA and Internal Control DNA 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 negative result for *Faecalibacterium prausnitzii* DNA is unlikely since this bacterial group belongs to the human commensal bacteria. If a negative result occurs for *Faecalibacterium prausnitzii* DNA, it is likely that (upon use of the ICD as inhibition control) the sample extraction was not successful. If a negative result occurs for *Faecalibacterium prausnitzii* DNA, it is recommended to improve isolation and purification of the sample and repeat amplification.**

11.1 Quantification of samples

To quantify *Faecalibacterium prausnitzii* positive samples, a standard curve with the **Standard A**, **Standard B** and **Standard 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: ABI 7500 (Applied Biosystems), 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 (Standard B**) has to be included in the experimental set-up as calibrator for each new real-time PCR run.**

To quantify *Faecalibacterium prausnitzii* positive samples, all standard samples (A, B and C), the positive and the 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.

With the quantitative RIDA®GENE *Faecalibacterium prausnitzii* multiplex real-time PCR the amount of DNA in copies/reaction of the parameter is calculated. The conversion into the concentration unit cells/g stool sample is done with a correction factor K and takes into account the dilutions 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 *Faecalibacterium prausnitzii* multiplex 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
- DNA extract from total eluate used for PCR reaction
- Number of target sequence in the whole genome

Tab. 12: Example calculation of correction factor using Maxwell[®] RSC (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**	x 20
Target sequence contained 5x in total <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> genome	x 0.2 (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)
Correction factor K for <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ***	0.40 x 10 ²

* Result corresponds to 1 g stool

** Corresponding to a total eluate of 100 µl (= 1/20)

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

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

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 *Faecalibacterium prausnitzii* 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 (16S-rRNA).

13. Performance characteristics

13.1 Analytical sensitivity

The RIDA[®] GENE *Faecalibacterium prausnitzii* multiplex real-time PCR has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for *Faecalibacterium prausnitzii*.

The following figure 2 shows a dilution series of *Faecalibacterium prausnitzii* (10^6 - 10^2 DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II.

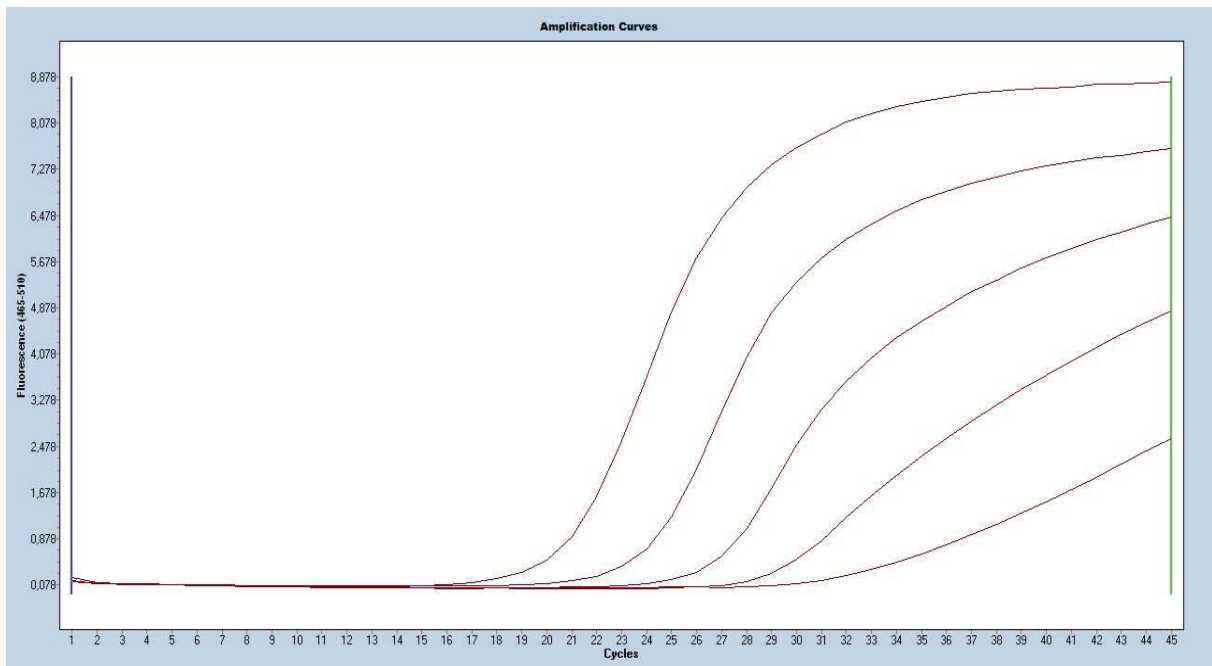


Fig. 2: Dilution series *Faecalibacterium prausnitzii* (10^6 – 10^2 DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

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

13.2 Analytical specificity

The RIDA[®] GENE *Faecalibacterium prausnitzii* multiplex real-time PCR is specific for *Faecalibacterium prausnitzii*. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab. 13):

Tab. 13: Cross-reactivity testing










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

14. Version history

Version number	Chapter and designation
2019-07-01	General revision 3. Test principle 4. Reagents provided 5. Storage instructions 6. Additional necessary reagents and necessary equipment 7. Precautions for users 8. Collection and storage of samples 9. Test procedure 10. Quality control 11. Result interpretation 13. Performance characteristics 14. Version history 15. Explanation of symbols

15. Explanation of symbols

General symbols

	For in vitro diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Testspecific symbols

Not applicable

16. Literature

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

RIDA[®] GENE *Faecalibacterium prausnitzii*

REF PG0155

1. Uso previsto

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

2. Resumen y descripción del ensayo

Faecalibacterium prausnitzii es una bacteria comensal, grampositiva, estrictamente anaeróbica y pertenece a la familia de *Clostridiaceae*. *F. prausnitzii* es una de las bacterias más importantes en la flora del tracto gastrointestinal humana y constituye hasta el 5 a 10 % del número total de bacterias detectadas en muestras de heces de humanos sanos.¹ La localización de *F. prausnitzii* parecía depender de las condiciones anaeróbicas que solo se encuentran en el tracto gastrointestinal inferior.² En la infancia temprana, la cantidad *F. prausnitzii* es muy baja y aumenta después del establecimiento de bacterias primocolonizadoras.² Son estrictamente anaeróbicas y, por tanto, difícil de reproducir en cultivo. Por consiguiente, esto explica porqué aún se entiende muy poco sobre los mecanismos de su potencial protección. *F. prausnitzii* produce derivados de ácido butírico, por ejemplo, butirato, que es fundamental para la actividad intestinal. Los butiratos juegan un papel importante para el metabolismo en el colon. Sirven como fuentes de energía para los colonocitos, tienen efectos antiinflamatorios y mantienen la actividad de enzimas bacterianas y protegen al sistema digestivo contra patógenos intestinales.³ Los cambios en la cantidad de *F. prausnitzii* son una indicación de disbiosis en la microbiota intestinal humana. En pacientes con diabetes y trastornos intestinales inflamatorios crónicos (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de colon irritable [SCI]) se detecta una reducción importante de *F. prausnitzii*. En el último caso, la barrera intestinal se altera, o más bien, la pared intestinal se vuelve más permeable. Esto da lugar a un intercambio no regulado de masa y provoca enfermedades diarreicas y reacciones inflamatorias.

3. Principio del ensayo

RIDA[®]GENE *Faecalibacterium prausnitzii* es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa y cuantitativa directa de *Faecalibacterium prausnitzii* a partir de muestras de heces humanas.

Después del aislamiento del ADN, ocurre la amplificación del fragmento génico (si está presente) específico de *Faecalibacterium prausnitzii* (ARNr 16S). Las dianas amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. Con los estándares **Standard A**, **Standard B** y **Standard C**, incluidos en el kit, es posible cuantificar los resultados. La cantidad de ADN identificada en la muestra (copias/reacción) se convierte en unidades de concentración células/g de heces con un factor de corrección (K, consulte también la tabla 12). El kit de PCR multiplex en tiempo real RIDA[®]GENE *Faecalibacterium prausnitzii* contiene un **Internal Control DNA** (ICD) que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rojo
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul
10²	Standard A	1x	100 µl	azul oscuro
10⁴	Standard B	1x	100 µl	azul oscuro
10⁶	Standard C	1x	100 µl	azul oscuro

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos contra la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse sin abrir hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a entre 2 °C y 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta **20 ciclos de congelación/descongelación** sin que esto afecte la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente dividir en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de manera adecuada (a entre 2 °C y 8 °C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Faecalibacterium prausnitzii es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Equipo de PCR en tiempo real:	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para uso con el LightCycler® 2.0
- **RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II**
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro

- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua sin nucleasas)

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso.

Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ADN a partir de muestras de heces humanas, use un kit de aislamiento de ADN (como RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recomienda diluir las muestras de heces 1:3 con agua antes de la extracción. Agite intensamente en un mezclador vórtex la muestra de heces diluida y centrifúguela a 1000 x g durante 30 segundos. Use el volumen adecuado de sobrenadante según las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA[®] GENE Faecalibacterium prausnitzii contiene Internal Control DNA que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El Internal Control DNA puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de

extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control**, el **Internal Control DNA**, y el **Standard A**, **Standard B** y **Standard C** antes de usarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante la etapa de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

Tabla 4: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

Control negativo: Agregue 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

Muestra: Agregue 5 µl de eluato a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Agregue 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Estándar (A, B, C): Agregue 5 µl de **Standard** (A, B, C) a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR de los estándares.

Nota: El uso de los siguientes cicladores requiere que se incluya una curva estándar en cada análisis: **ABI 7500 (Applied Biosystems)** y **CFX96™ (Bio-Rad)**.

En todos los demás cicladores solo es necesario incluir una muestra de la curva estándar (Standard B) como calibrador en la preparación experimental de cada nuevo análisis de PCR en tiempo real. Aquí, solo es necesaria la aplicación de una curva estándar una vez por número de lote.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7 y 8).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil de ADN por PCR en tiempo real para los equipos serie LightCycler® y Rotor-Gene Q

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil de ADN por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Nota: El número total de copias por reacción de **Standard A**, **Standard B** y **Standard C** debe anotarse en el archivo de configuración (archivo Setup) del programa de software del ciclador de la PCR en tiempo real que corresponda. Se emplea un volumen total de 5 µl de ADN para obtener las siguientes concentraciones:

Estándar A: 5 x 10² copias/reacción

Estándar B: 5 x 10⁴ copias/reacción

Estándar C: 5 x 10⁶ copias/reacción

Nota: La curva estándar se puede guardar, para cada parámetro, en el ciclador de la PCR en tiempo real. Excepto en los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad), solo es necesario obtener la curva estándar una vez por cada número de lote. Los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad) requieren que se incluya una curva estándar en cada análisis. En todos los demás cicladores solo es necesario incluir una muestra de la curva estándar (**Standard B**) como calibrador en la preparación experimental de cada nuevo análisis de PCR en tiempo real.

9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

Nota: El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN y ARN RIDA® GENE por PCR en tiempo real.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real en el equipo LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 8: Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500, CFX96™ y Rotor-Gene Q

Transcripción inversa	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Nota: El número total de copias por reacción de **Standard A**, **Standard B** y **Standard C** debe anotarse en el archivo de configuración (archivo Setup) del programa de software del ciclador de la PCR en tiempo real que corresponda. Se emplea un volumen total de 5 µl de ADN para obtener las siguientes concentraciones:

Estándar A: 5×10^2 copias/reacción

Estándar B: 5×10^4 copias/reacción

Estándar C: 5×10^6 copias/reacción

Nota: La curva estándar se puede guardar, para cada parámetro, en el ciclador de la PCR en tiempo real. Excepto en los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad), solo es necesario obtener la curva estándar una vez por cada número de lote. Los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad) requieren que se incluya una curva estándar en cada análisis.

En todos los demás cicladores solo es necesario incluir una muestra de la curva estándar (**Standard B**) como calibrador en la preparación experimental de cada nuevo análisis de PCR en tiempo real.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 2.0	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	530	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración
	ICD	Amarillo	

10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figura 1) para determinar que un ensayo es válido.

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

Tabla 10: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	ND *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	No es detectable

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

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

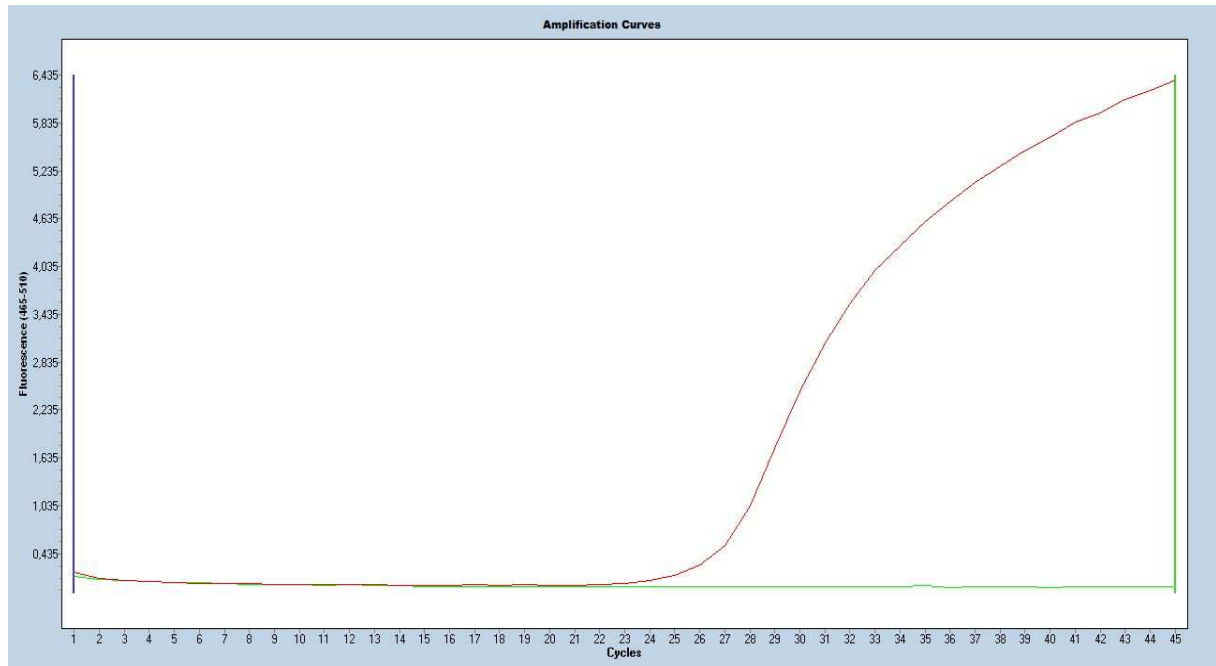


Fig. 1: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Faecalibacterium prausnitzii*) en el LightCycler® 480II

10.1 Validez de la detección cuantitativa

Para que la prueba diagnóstica cuantitativa sea válida, se deben cumplir todas las condiciones de control de una prueba diagnóstica cualitativa válida. Además, para obtener resultados de cuantificación exactos, se debe generar también una curva estándar válida. Para tener una prueba diagnóstica cuantitativa válida, los parámetros de control de la curva estándar deben alcanzar los siguientes valores.

	Parámetro de control	Valor válido
Roche LightCycler® 2.0	Eficiencia	1,9 – 2,1
Roche LightCycler® 480II	Eficiencia	1,9 – 2,1
	Pendiente	-3,1 – -3,6
Agilent Techn. Mx3005P	Rs _q	>0,98
	Pendiente	-3,1 – -3,6
ABI 7500	R ²	>0,98
	Pendiente	-3,1 – -3,6
Bio-Rad CFX96™	R ²	>0,98
	Pendiente	-3,1 - -3,6
Qiagen Rotor-Gene Q	R ²	>0,98
	M	3,1 – -3,6

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

Tabla 11: Interpretación de las muestras

Genes diana		
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ICD	Resultado
positivo	positivo/negativo	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> detectado
negativo*	positivo	Genes diana no detectados*
negativo	negativo	No válido

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

También se detecta *Faecalibacterium prausnitzii* si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no del Internal Control DNA en el sistema de detección.

La detección del control de amplificación interno no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control DNA** sea débil o esté ausente.

No se detecta *Faecalibacterium prausnitzii* si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del ADN del **Internal Control DNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra ni del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

***Nota: Es poco probable que se obtenga un resultado negativo de ADN de *Faecalibacterium prausnitzii*, ya que este grupo bacteriano pertenece a las bacterias comensales humanas. Si se obtiene un resultado negativo de ADN de *Faecalibacterium prausnitzii*, es probable que, al usar el ICD como control de inhibición, la extracción de la muestra no haya sido correcta. Si se obtiene un resultado negativo de ADN de *Faecalibacterium prausnitzii*, se recomienda mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra y repetir la amplificación.**

11.1 Cuantificación de las muestras

Para cuantificar las muestras positivas para *Faecalibacterium prausnitzii*, se debe procesar por separado una curva estándar con el **Standard A**, el **Standard B** y el **Standard C**. La medición de la curva estándar debe guardarse aparte. No obstante, se puede usar la medición de la misma curva estándar en todos los análisis con productos del mismo número de lote, importando el experimento guardado.

Nota: Esto no es válido con los siguientes cicladores: ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad). Aquí, es necesario medir una curva estándar con cada análisis. En todos los demás cicladores es necesario incluir una muestra de la curva estándar (Standard B**) en la preparación experimental como calibrador para cada nuevo análisis de PCR en tiempo real.**

Para cuantificar las muestras positivas para *Faecalibacterium prausnitzii*, es necesario cuantificar, seleccionar y analizar todas las muestras de estándar (A, B y C), los controles positivo y negativo, y las muestras desconocidas siguiendo las instrucciones del fabricante del ciclador.

Con el ensayo cuantitativo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE *Faecalibacterium prausnitzii*, se calcula la cantidad de ADN en copias/reacción del parámetro. La conversión a unidades de concentración (células/g de muestra de heces) se lleva a cabo con un factor de corrección K y se toman en cuenta las

diluciones del procedimiento de extracción (dependiendo del kit de extracción usado) y la preparación de la PCR, así como el número de secuencias diana en el genoma completo.

La conversión del resultado del ensayo cuantitativo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE *Faecalibacterium prausnitzii* a células/g de heces se calcula con la siguiente fórmula:

$$C \text{ [células/g de heces]} = c \text{ [copias/reacción]} \times K$$

C [células/g de heces] - concentración de bacterias en la muestra, en células/g de heces

c [copias/reacción] - concentración de ADN en la reacción de PCR
(resultado de la PCR cuantitativa)

K - factor de corrección

Para calcular el factor de corrección, hay que tener en cuenta la siguiente información:

- Dilución de las muestras
- Volumen inicial de muestra para la extracción del ADN
- ADN extraído del eluato total usado para la reacción de PCR
- Número de secuencias diana en el genoma completo

Tabla 12: Ejemplo de cálculo del factor de corrección con Maxwell® RSC (Promega) para la preparación de una muestra diluida 1:3

Descripción	Factor
Dilución 1:3 de la muestra antes de la extracción	x 3
300 µl de muestra para extracción*	x 3,33
5 µl de extracto de ADN en la reacción de PCR**	x 20
Secuencia diana contenida 5 veces en el genoma total de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	x 0,2 (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)
Factor de corrección K para <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ***	0,40 x 10 ²

* El resultado corresponde a 1 g de heces

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

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

Nota: Para obtener más información sobre la cuantificación, póngase en contacto con mdx@r-biopharm.de.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces humanas.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión de la sonda pueden afectar a la detección de nuevas variantes, y producir un resultado falso negativo con el ensayo RIDA®GENE Faecalibacterium prausnitzii.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia de los genes diana (ARNr 16S).

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE *Faecalibacterium prausnitzii* tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de ADN por reacción para *Faecalibacterium prausnitzii*.

En la figura 2, a continuación, se muestra una dilución seriada de *Faecalibacterium prausnitzii* (10^6 - 10^2 copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II.

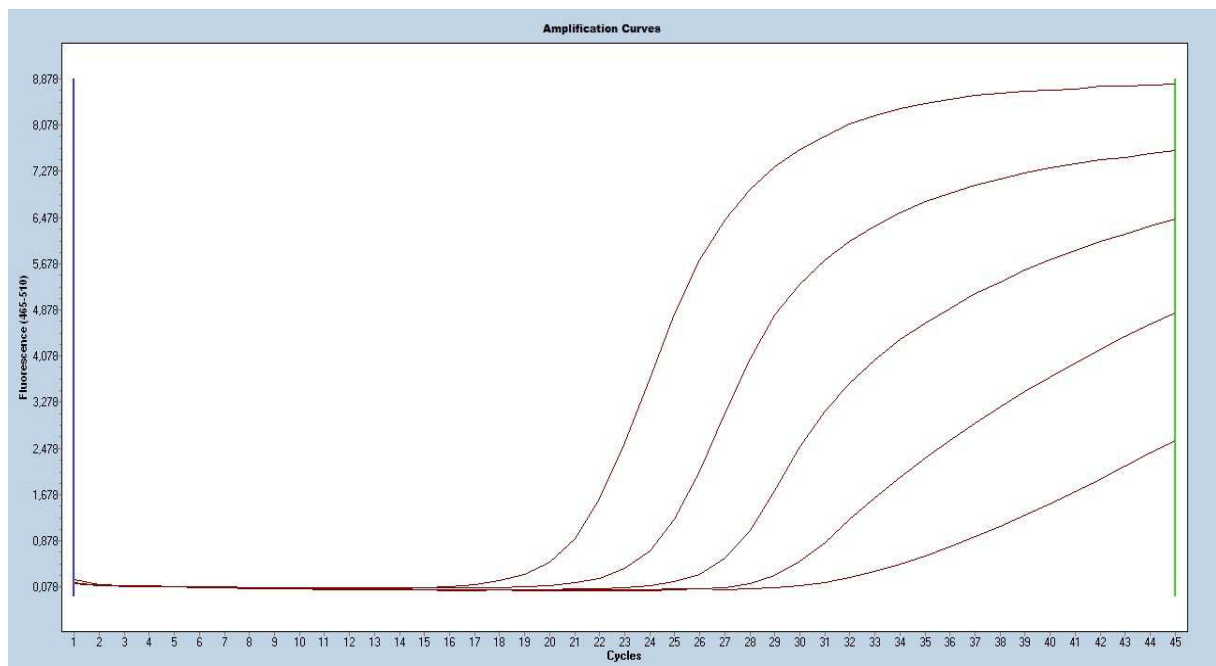


Fig. 2: Dilución seriada de *Faecalibacterium prausnitzii* (10^6 – 10^2 copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

13.2 Especificidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE *Faecalibacterium prausnitzii* es específico para *Faecalibacterium prausnitzii*. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 13):

Tabla 13: Ensayos de reactividad cruzada










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

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2019-07-01	Revisión general 3. Principio del ensayo 4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 7. Precauciones para los usuarios 8. Obtención y almacenamiento de muestras 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 11. Interpretación de los resultados 13. Características de rendimiento 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Bibliografía

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

RIDA[®] GENE Faecalibacterium prausnitzii

REF PG0155

1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. RIDA[®] GENE Faecalibacterium prausnitzii est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative et quantitative directe d'ADN de *Faecalibacterium prausnitzii* dans les échantillons de selles humaines.

2. Résumé et explication du test

Faecalibacterium prausnitzii est une bactérie commensale gram-positif, strictement anaérobie, appartenant à la famille des *Clostridiaceae*. Représentant 5 à 10 % du nombre total de bactéries détectées dans les échantillons de selles provenant d'humains en bonne santé, *F. prausnitzii* est l'une des bactéries les plus importantes de la flore intestinale humaine¹. La localisation de *F. prausnitzii* semble être liée aux conditions anaérobies uniquement observées au niveau du tractus gastro-intestinal inférieur². Dans la petite enfance, le nombre de *F. prausnitzii* est très faible et augmente après l'établissement de bactéries primo-colonisatrices². Difficiles à cultiver en raison de leur nature strictement anaérobie, les mécanismes de leur potentiel protecteur sont encore mal compris. *F. prausnitzii* produit des dérivés d'acide butyrique (tels que le butyrate) essentiels à l'activité intestinale. Les butyrates jouent un rôle important dans le métabolisme du côlon. Ils servent de source d'énergie aux colonocytes, ont des effets anti-inflammatoires, contribuent à l'activité des enzymes bactériennes et protègent le système digestif des pathogènes intestinaux³. Chez l'homme, toute variation du nombre de *F. prausnitzii* est une indication de dysbiose intestinale. Une réduction significative de *F. prausnitzii* est observée chez les patients atteints de diabète et de troubles intestinaux inflammatoires chroniques (maladie de Crohn, colites ulcéreuses, syndrome du côlon irritable [SCI]). Dans ce dernier cas, la barrière intestinale est perturbée, ce qui, en d'autres termes, signifie que la paroi intestinale devient plus perméable. Ceci induit un échange de masse non régulé et provoque des maladies diarrhéiques et des réactions inflammatoires.

3. Principe du test

RIDA® GENE *Faecalibacterium prausnitzii* est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative et quantitative directe de *Faecalibacterium prausnitzii* dans les échantillons de selles humaines.

Après isolation de l'ADN survient l'amplification du fragment de gène (si présent) spécifique à *Faecalibacterium prausnitzii* (ARNr 16S). Les cibles amplifiées sont détectées grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons.

Pendant l'étape d'extension, la Taq-Polymerase rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Avec les standards, Standard A, Standard B et Standard C inclus dans le kit, il est possible de quantifier les résultats. La quantité d'ADN identifié dans l'échantillon (copies/réaction) est convertie en unités de concentration (cellules)/g d'échantillons de selles à l'aide d'un facteur de correction K (voir aussi le tableau 12). Le kit de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE *Faecalibacterium prausnitzii* contient un ADN de contrôle interne Internal Control DNA (ICD) qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante.

4. Contenu du paquet

Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	jaune
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rouge
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu
10 ²	Standard A	1x	100 µl	bleu foncé
10 ⁴	Standard B	1x	100 µl	bleu foncé
10 ⁶	Standard C	1x	100 µl	bleu foncé

5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. S'ils ne sont pas ouverts, tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à **20 cycles de congélation/décongélation** sans que la performance du test soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Faecalibacterium prausnitzii peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

Tableau 2 : Matériel nécessaire

Plateforme d'extraction	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Instrument de PCR en temps réel :	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque : utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 2.0
- **RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les appareils LightCycler® 480II**
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction

- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (sans nucléase)

7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée.

Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'échantillon à partir d'échantillons de selles

Pour isoler l'ADN des échantillons de selles humaines, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell® RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Il convient de diluer les échantillons de selles avant extraction avec de l'eau selon un rapport de 1/3. Agiter fortement l'échantillon de selles dilué et le centrifuger à 1 000 x g pendant 30 s. Utiliser le volume adéquat du surnageant conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA® GENE Faecalibacterium prausnitzii inclut un ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de **Internal Control DNA** pendant la procédure d'extraction. Le **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl d'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et de contrôle positif de la PCR.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, le **Positive Control**, le **No Template Control**, l'**Internal Control DNA** et les **Standard A**, **Standard B** et **Standard B** avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

Tableau 3 : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

Tableau 4 : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
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
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

Contrôle négatif : Ajouter 5 µl de **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

Échantillon : Ajouter 5 µl d'éluat au mélange maître pré-pipeté.

Contrôle positif : Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la PCR.

Standard (A, B, C) : Ajouter 5 µl de **Standard** (A, B, C) au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de PCR des étalons.

Remarque : lorsque les thermocycleurs suivants sont utilisés, il faut inclure une courbe standard dans chaque analyse : ABI 7500 (Applied Biosystems) et CFX96™ (Bio-Rad).

Pour tout autre type de thermocycleur, seul un échantillon de la courbe standard (**Standard) doit être inclus dans la configuration expérimentale en tant que calibre pour chaque nouvelle analyse de PCR en temps réel. Dans ce cas, il est seulement nécessaire d'appliquer une courbe standard une fois par numéro de lot.**

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6, 7, 8).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

Tableau 5 : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour la série LightCycler® et Rotor-Gene Q

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 6 : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Remarque : le nombre total de copies par réaction des **Standard A**, **Standard B** et **Standard C** doit être saisi dans le Fichier de configuration du logiciel du thermocycleur de PCR en temps réel. Utiliser un volume total de 5 µl d'ADN pour obtenir les concentrations suivantes :

Étalon A : 5×10^2 copies/réaction

Étalon B : 5×10^4 copies/réaction

Étalon C : 5×10^6 copies/réaction

Remarque : la courbe standard peut être incluse sur le thermocycleur de PCR en temps réel pour chaque paramètre. Hormis avec l'ABI 7500 (Applied Biosystems) et le thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad), il est seulement nécessaire d'appliquer la courbe standard une fois par numéro de lot. Lorsque l'ABI 7500 (Applied Biosystems) et le thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad) sont utilisés, une courbe standard doit être incluse dans chaque analyse. Pour tout autre type de thermocycleur, seul un échantillon de la courbe standard (**Standard B**) doit être inclus dans la configuration expérimentale en tant que calibreur pour chaque nouvelle analyse de PCR en temps réel.

9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

Remarque : le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel RIDA® GENE DNA et ARN sont effectués lors d'une même exécution.

Tableau 7 : Profil universel de PCR en temps réel pour la série LightCycler®

Transcription inverse	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
PCR Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 8 : Profil universel de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, CFX96™ et Rotor-Gene Q

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Remarque : le nombre total de copies par réaction des **Standard A**, **Standard B** et **Standard C** doit être saisi dans le Fichier de configuration du logiciel du thermocycleur de PCR en temps réel. Utiliser un volume total de 5 µl d'ADN pour obtenir les concentrations suivantes :

Étalon A : 5×10^2 copies/réaction

Étalon B : 5×10^4 copies/réaction

Étalon C : 5×10^6 copies/réaction

Remarque : la courbe standard peut être incluse sur le thermocycleur de PCR en temps réel pour chaque paramètre. Hormis avec l'ABI 7500 (Applied Biosystems) et le thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad), il est seulement nécessaire d'appliquer la courbe standard une fois par numéro de lot. Lorsque l'ABI 7500 (Applied Biosystems) et le thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad) sont utilisés, une courbe standard doit être incluse dans chaque analyse.

Pour tout autre type de thermocycleur, seul un échantillon de la courbe standard (**Standard B**) doit être inclus dans la configuration expérimentale en tant que calibre pour chaque nouvelle analyse de PCR en temps réel.

9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 9 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 2.0	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	530	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) est nécessaire
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	465/510	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux
	ICD	Jaune	

10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle positif et le contrôle négatif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 10, figure 1) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le **Positive Control** a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 copies de contrôle positif.

Tableau 10 : Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

Échantillon	Résultat du test	Ct ICD	Ct cible
Contrôle positif	Positif	S/O * ¹	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	Non détectable

*¹ Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test

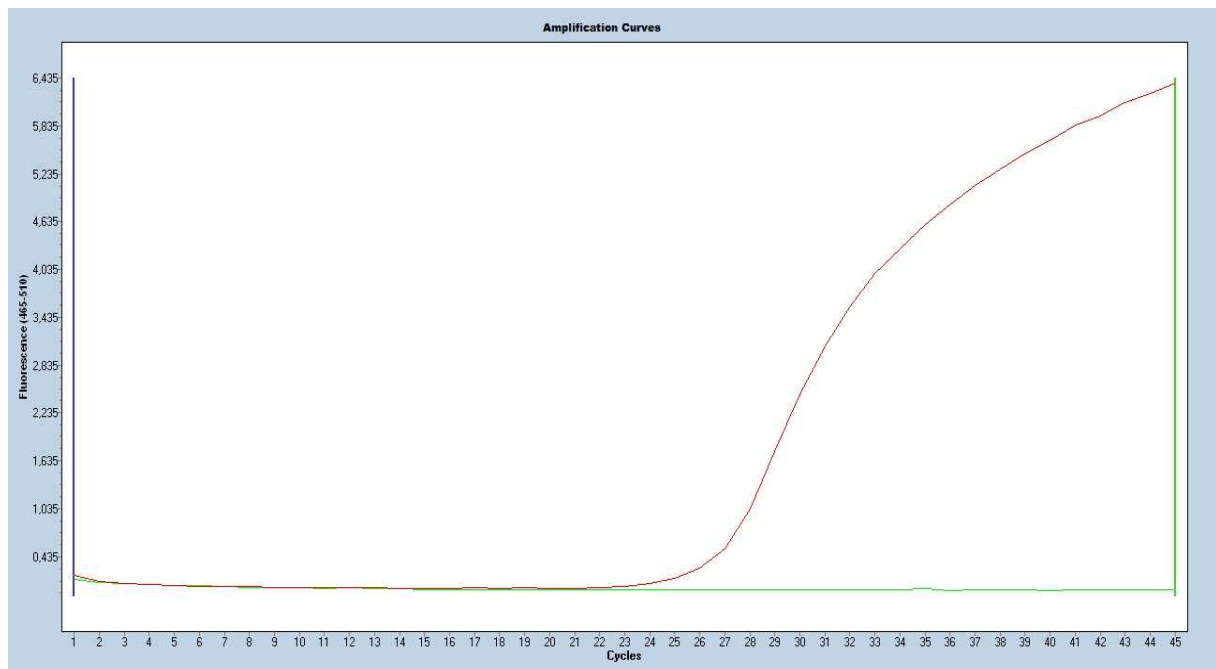


Figure 1 : Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Faecalibacterium prausnitzii*) sur le LightCycler® 480II

10.1 Validité de la détection quantitative

Pour que l'exécution du test de diagnostic quantitatif soit valide, toutes les conditions de contrôle d'une exécution de test de diagnostic quantitatif valide doivent être satisfaites. De plus, pour obtenir des résultats de quantification exacts, il est nécessaire de générer une courbe standard valide. Pour que l'exécution de test de diagnostic quantitatif soit valide, les valeurs suivantes doivent être obtenues pour les paramètres de contrôle de la courbe standard.

	Paramètres de contrôle	Valeur valide
Roche LightCycler® 2.0	Efficacité	1,9 – 2,1
Roche LightCycler® 480II	Efficacité	1,9 – 2,1
	Pente	-3,1 – -3,6
Agilent Techn. Mx3005P	Rs _q	> 0,98
	Pente	-3,1 – -3,6
ABI 7500	R ²	> 0,98
	Pente	-3,1 – -3,6
Bio-Rad CFX96™	R ²	> 0,98
	Pente	-3,1 à -3,6
Qiagen Rotor-Gene Q	R ²	> 0,98
	M	3,1 – -3,6

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

Tableau 11 : Interprétation des échantillons

Gènes cibles		
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ICD	Résultat
positif	positif/négatif	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> détecté
négatif*	positif	Gènes cibles non détectés*
négatif	négatif	Non valide

Faecalibacterium prausnitzii est détecté si l'ADN de l'échantillon et le Internal Control DNA présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Faecalibacterium prausnitzii est également détecté si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le **Internal Control DNA**. La détection du contrôle d'amplification interne n'est pas nécessaire, car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent de l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA**.

Faecalibacterium prausnitzii n'est pas détectée si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA**. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection de l'ADN du contrôle interne **Internal Control DNA**.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR. L'échantillon extrait doit encore être dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

***Remarque : un résultat négatif pour l'ADN de *Faecalibacterium prausnitzii* est peu probable dans la mesure où ce groupe bactérien appartient à la catégorie des bactéries commensales humaines. En cas de résultat négatif pour l'ADN de *Faecalibacterium prausnitzii*, il est probable que l'extraction de l'échantillon n'ait pas abouti lors de l'utilisation de l'ICD comme contrôle de l'inhibition. En cas de résultat négatif pour l'ADN de *Faecalibacterium prausnitzii*, il est recommandé d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon et de recommencer l'amplification.**

11.1 Quantification des échantillons

Pour quantifier les échantillons positifs à *Faecalibacterium prausnitzii*, il faut effectuer séparément une courbe standard avec les **Standard A**, **Standard B** et **Standard C**. La mesure de la courbe standard doit être enregistrée séparément. Cependant, il est possible d'utiliser la même mesure de courbe standard dans toutes les analyses avec les produits issus d'un même numéro de lot pour importer l'expérimentation enregistrée.

Remarque : cela ne concerne pas les thermocycleurs suivants : ABI 7500 (Applied Biosystems) et CFX96™ (Bio-Rad). Pour ceux-ci, il faut mesurer une courbe standard pour chaque analyse. Pour tout autre type de thermocycleur, un échantillon de la courbe standard (Standard B**) doit être inclus dans la configuration expérimentale en tant que calibre pour chaque nouvelle analyse de PCR en temps réel.**

Pour quantifier les échantillons positifs à *Faecalibacterium prausnitzii*, tous les échantillons de standard (A, B et C), le contrôle positif et le contrôle négatif, ainsi que

les échantillons inconnus à quantifier doivent être sélectionnés et analysés selon les instructions du fabricant du thermocycleur.

Avec le test de PCR en temps réel multiplexe quantitatif RIDA®GENE

Faecalibacterium prausnitzii, le nombre de copies d'ADN/réaction du paramètre est calculé. La conversion en unités de concentration (cellules)/g d'échantillons de selles est effectuée à l'aide d'un facteur de correction K et tient compte des dilutions de la procédure d'extraction (en fonction du kit d'extraction utilisé) et de la configuration de la PCR, ainsi que du nombre de séquences cibles dans l'ensemble du génome.

La conversion des résultats du test de PCR en temps réel multiplexe quantitatif RIDA®GENE Faecalibacterium prausnitzii en cellules/g de selles est calculée en utilisant la formule suivante :

$$C \text{ [copies/g selles]} = c \text{ [copies/réaction]} \times K$$

C [copies/g selles] - concentration bactérienne de l'échantillon en cellules/g de selles

c [copies/réaction] - concentration d'ADN dans la réaction de PCR
(résultat de la PCR quantitative)

K - facteur de correction

Pour le calcul du facteur de correction, les informations suivantes doivent être prises en compte :

- Dilution de l'échantillon
- Volume initial de l'échantillon pour l'extraction d'ADN
- Extrait d'ADN à partir de l'éluat total utilisé pour la réaction de PCR
- Nombre de séquences cibles dans l'ensemble du génome

Tableau 12 : Exemple de calcul du facteur de correction à l'aide de Maxwell® RSC (Promega) pour préparation d'un échantillon dilué selon un rapport 1/3

Description	Facteur
Dilution de l'échantillon à 1/3 avant extraction	x 3
Échantillon de 300 µl pour extraction*	x 3,33
5 µl d'extrait d'ADN dans la réaction de PCR**	x 20
Séquence cible contenue 5x dans l'ensemble du génome <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	x 0,2 (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)
Facteur de correction K pour <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ***	0,40 x 10 ²

* Le résultat correspond à 1 g de selles

** Correspond à un éluat total de 100 µl (= 1/20)

*** Cette valeur peut être enregistrée dans l'instrument de PCR en temps réel

Remarque : Pour en savoir plus sur la quantification, veuillez contacter mdx@r-biopharm.de.

12. Limites de la méthode

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de selles humaines.
3. Les prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects de l'échantillon ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA[®]GENE Faecalibacterium prausnitzii.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence des gènes cibles (ARNr 16S).

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE *Faecalibacterium prausnitzii* est ≥ 10 copies d'ADN par réaction pour *Faecalibacterium prausnitzii*.

La figure 2 ci-dessous présente une série de dilutions de *Faecalibacterium prausnitzii* ($10^6 - 10^2$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II.

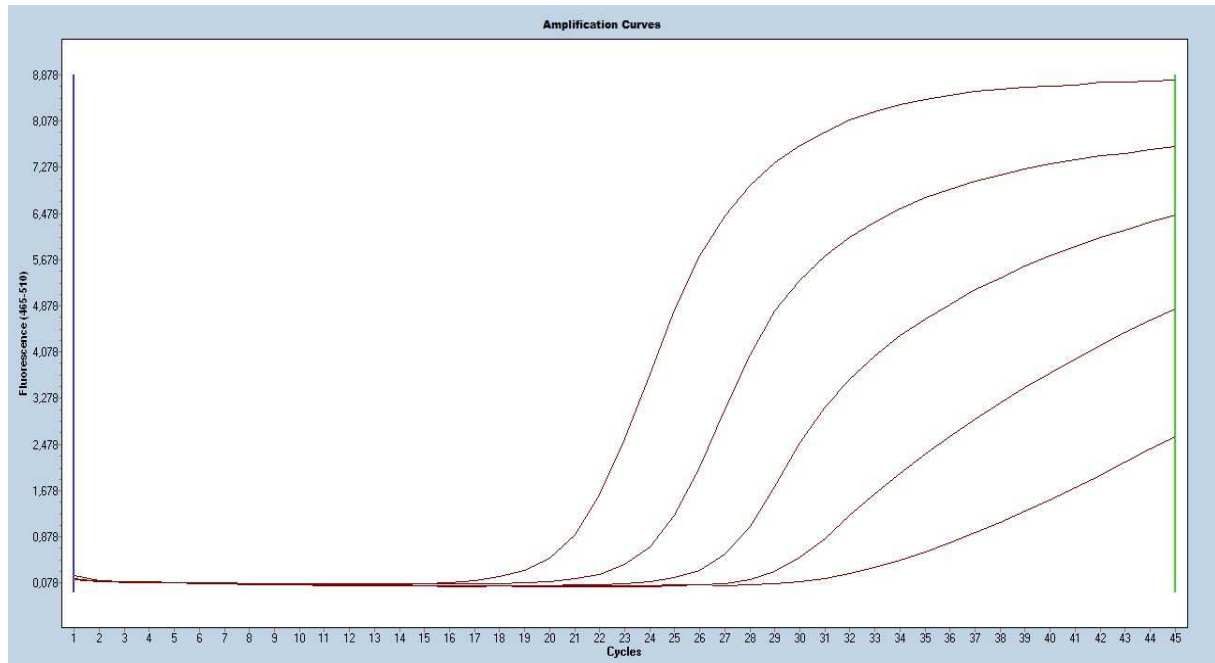


Figure 2 : Série de dilutions pour *Faecalibacterium prausnitzii* ($10^6 - 10^2$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la concentration de l'ADN.

13.2 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE *Faecalibacterium prausnitzii* est spécifique à *Faecalibacterium prausnitzii*. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 13) :

Tableau 13 : Test de la réactivité croisée










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

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2019-07-01	Révision générale 3. Principe du test 4. Contenu du paquet 5. Instructions de conservation des réactifs 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 7. Mesures de précaution 8. Prélèvement et conservation des échantillons 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 11. Interprétation des résultats 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>in vitro</i>
	Consulter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Référence
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Sans objet

16. Bibliographie

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

RIDA[®] GENE *Faecalibacterium prausnitzii*

REF PG0155

1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA[®] GENE *Faecalibacterium prausnitzii* è un test di PCR real-time multiplex per la determinazione qualitativa diretta e la quantificazione di DNA di *Faecalibacterium prausnitzii* da campioni fecali umani.

2. Sintesi e spiegazione del test

Il *Faecalibacterium prausnitzii* è un batterio commensale gram-positivo, strettamente anaerobico e appartiene alla famiglia *Clostridiaceae*. L'*F. prausnitzii* è uno dei batteri più importanti della flora intestinale umana e rappresenta fino al 5-10 % del numero totale di batteri rivelati nei campioni fecali di esseri umani sani.¹ La presenza di *F. prausnitzii* sembra dipendere da condizioni anaerobiche che si trovano solo nell'intestino inferiore.² Nella prima infanzia il numero di *F. prausnitzii* è molto basso e aumenta dopo l'insediamento di batteri primicolonizzanti.² Sono strettamente anaerobici e quindi difficili da far crescere in coltura. Questo spiega perché i meccanismi del suo potenziale di protezione sono ancora poco conosciuti. L'*F. prausnitzii* produce derivati dell'acido butirrico, come il butirrato, che sono essenziali per l'attività intestinale. I butirrati svolgono un ruolo importante per il metabolismo nel colon. Servono come fonti di energia per i colonociti e hanno effetti antinfiammatori, mantengono l'attività degli enzimi batterici e proteggono l'apparato digerente dai patogeni intestinali.³ Le variazioni nel numero di *F. prausnitzii* sono un'indicazione di disbiosi della flora intestinale umana. Una riduzione significativa di *F. prausnitzii* si osserva in pazienti affetti da diabete e disturbi infiammatori intestinali cronici (morbo di Crohn, colite ulcerosa, sindrome dell'intestino irritabile [SII]). In quest'ultimo caso, la barriera intestinale viene interrotta, o meglio, la parete intestinale diventa più permeabile. Questo porta a uno scambio di massa non regolato e causa malattie diarroiche e reazioni infiammatorie.

3. Principio del test

RIDA[®]GENE *Faecalibacterium prausnitzii* è un test di PCR real-time multiplex per la determinazione qualitativa diretta e quantitativa di *Faecalibacterium prausnitzii* da campioni fecali umani.

Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione del frammento genetico (se presente) specifico per *Faecalibacterium prausnitzii* (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 la 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 *Faecalibacterium prausnitzii* 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 Faecalibacterium prausnitzii 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 [®] 2.0, 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 II (PG0002) per l'uso con LightCycler[®] 2.0
- 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 dei 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 kit RIDA[®] GENE Faecalibacterium prausnitzii 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).**

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 le serie LightCycler® 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 la serie LightCycler®

Trascrizione inversa	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
PCR 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

Trascrizione inversa	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
PCR 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 **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® 2.0	<i>Fecalibacterium prausnitzii</i>	530	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Fecalibacterium prausnitzii</i>	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Fecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Fecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Fecalibacterium prausnitzii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Fecalibacterium prausnitzii</i>	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base
	ICD	Giallo	

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, Figura 1).

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

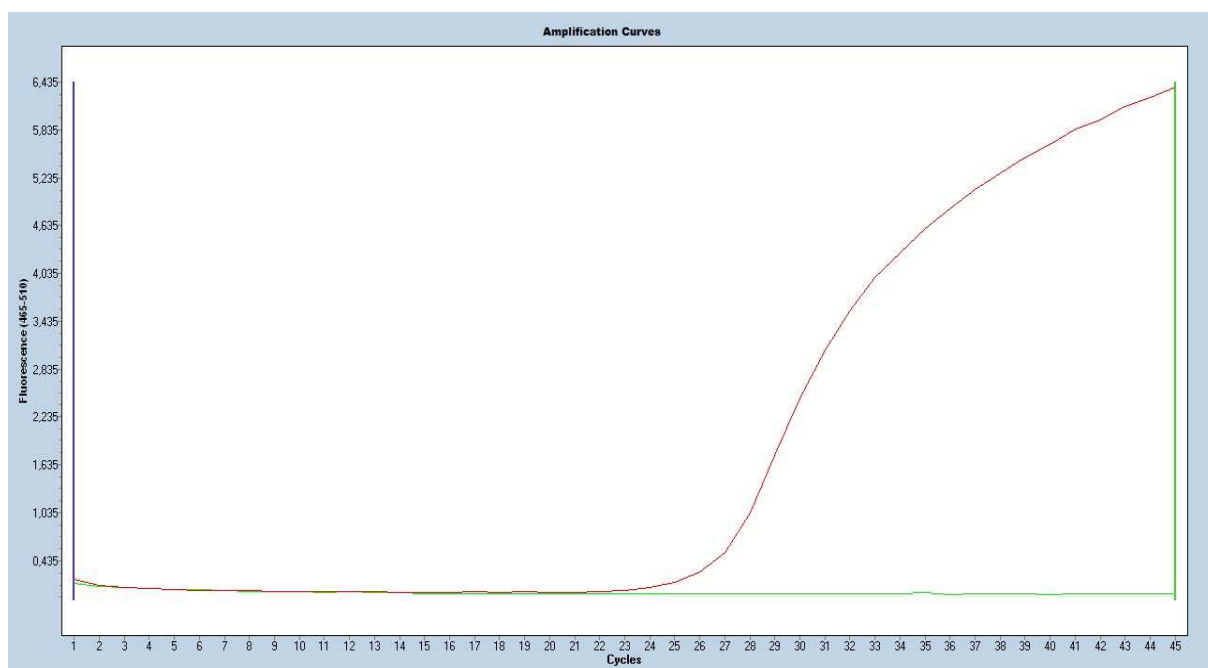


Figura 1: Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e negativo (verde) (*Faecalibacterium prausnitzii*) sul LightCycler® 480II

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
	Pendenza	-3,1 – -3,6
Roche LightCycler® 480II	Efficienza	1,9 – 2,1
	Pendenza	-3,1 – -3,6
Agilent Techn. Mx3005P	Rsq	>0,98
	Pendenza	-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>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ICD	Risultato
Positivo	Positivo/Negativo	Rivelazione di <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
Negativo*	Positivo	Geni target non rivelati*
Negativo	Negativo	Non valido

Viene rivelato il *Faecalibacterium prausnitzii* se sia il DNA del campione sia l'**Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Il *Faecalibacterium prausnitzii* è inoltre comprovabile 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.

Il *Faecalibacterium prausnitzii* non è comprovabile se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma nel sistema di rivelazione è presente un segnale per l'**Internal Control DNA**. 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 risultato negativo per il DNA di *Faecalibacterium prausnitzii* è improbabile, in quanto questo gruppo batterico appartiene ai batteri commensali umani. Se si riscontra un risultato negativo per il DNA di *Faecalibacterium prausnitzii* è verosimile che, utilizzando l'ICD come controllo di inibizione, l'estrazione del campione non sia avvenuta correttamente. In caso di risultato negativo per il DNA di *Faecalibacterium prausnitzii*, 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 *Faecalibacterium prausnitzii* 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 *Faecalibacterium prausnitzii*, 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.

Il kit di PCR real-time multiplex quantitativa RIDA®GENE *Faecalibacterium prausnitzii* calcola 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 di PCR real-time multiplex quantitativo RIDA®GENE *Faecalibacterium prausnitzii* in cellule/g di feci è calcolata con la formula seguente:

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

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)** 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
Sequenza target contenuta 5 volte nel genoma completo di <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	x 0,2 (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)
Fattore di correzione K per <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ***	0,40 x 10 ²

* Il risultato corrisponde a 1 g di feci

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

*** Questo valore può essere salvato nello strumento per la PCR real-time

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 con il test RIDA® GENE *Faecalibacterium prausnitzii* e causare un falso negativo.
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 *Faecalibacterium prausnitzii* ha un limite di rivelazione ≥ 10 copie di DNA per reazione per *Faecalibacterium prausnitzii*.

La figura 2 riportata di seguito mostra una serie di diluizioni di *Faecalibacterium prausnitzii* ($10^6 - 10^2$ copie di DNA per μl) su LightCycler® 480II.

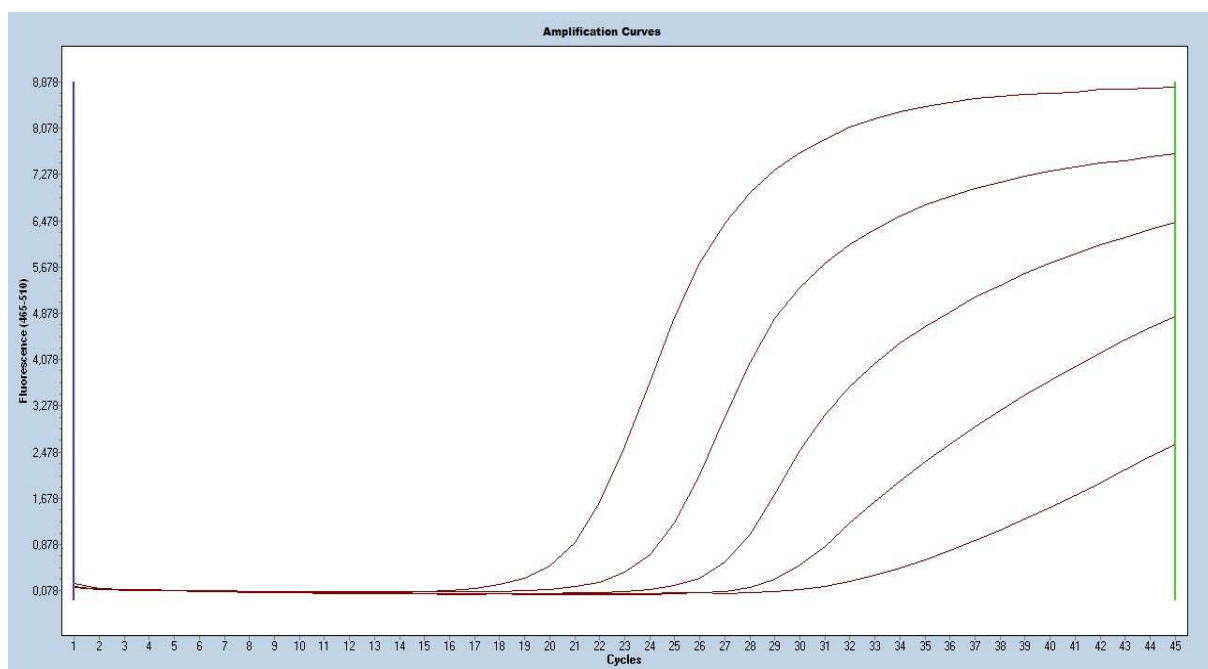


Fig. 2: Serie di diluizioni di *Faecalibacterium prausnitzii* ($10^6 - 10^2$ copie di DNA per μl) su LightCycler® 480II

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 test di PCR real-time multiplex RIDA[®] GENE *Faecalibacterium prausnitzii* è specifico per *Faecalibacterium prausnitzii*. Non è stata individuata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 13):

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

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2019-07-01	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 dei 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. Bibliografia

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