

## RIDA® GENE Faecalibacterium prausnitzii

**REF** PG0155



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



## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA® GENE 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.<sup>1</sup> La presenza di *F. prausnitzii* sembra dipendere da condizioni anaerobiche che si trovano solo nell'intestino inferiore.<sup>2</sup> Nella prima infanzia il numero di *F. prausnitzii* è molto basso e aumenta dopo l'insediamento di batteri primicolonizzanti.<sup>2</sup> 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.<sup>3</sup> 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<sup>®</sup>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<sup>®</sup>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 <sup>^2</sup>	Standard A	1x	100 µl	blu scuro
10 <sup>^4</sup>	Standard B	1x	100 µl	blu scuro
10 <sup>^6</sup>	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<sup>®</sup>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 <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC
Strumento per la PCR real-time:	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 2.0, LightCycler <sup>®</sup> 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 <sup>™</sup>
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](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit II (PG0002) per l'uso con LightCycler<sup>®</sup> 2.0
- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler<sup>®</sup> 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](http://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<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Totale</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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
	<b>Totale</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

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:  $5 \times 10^2$  copie/reazione

Standard B:  $5 \times 10^4$  copie/reazione

Standard C:  $5 \times 10^6$  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:**  $5 \times 10^2$  copie/reazione

**Standard B:**  $5 \times 10^4$  copie/reazione

**Standard C:**  $5 \times 10^6$  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/ $\mu$ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  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 <sup>*1</sup>	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	Non rivelabile

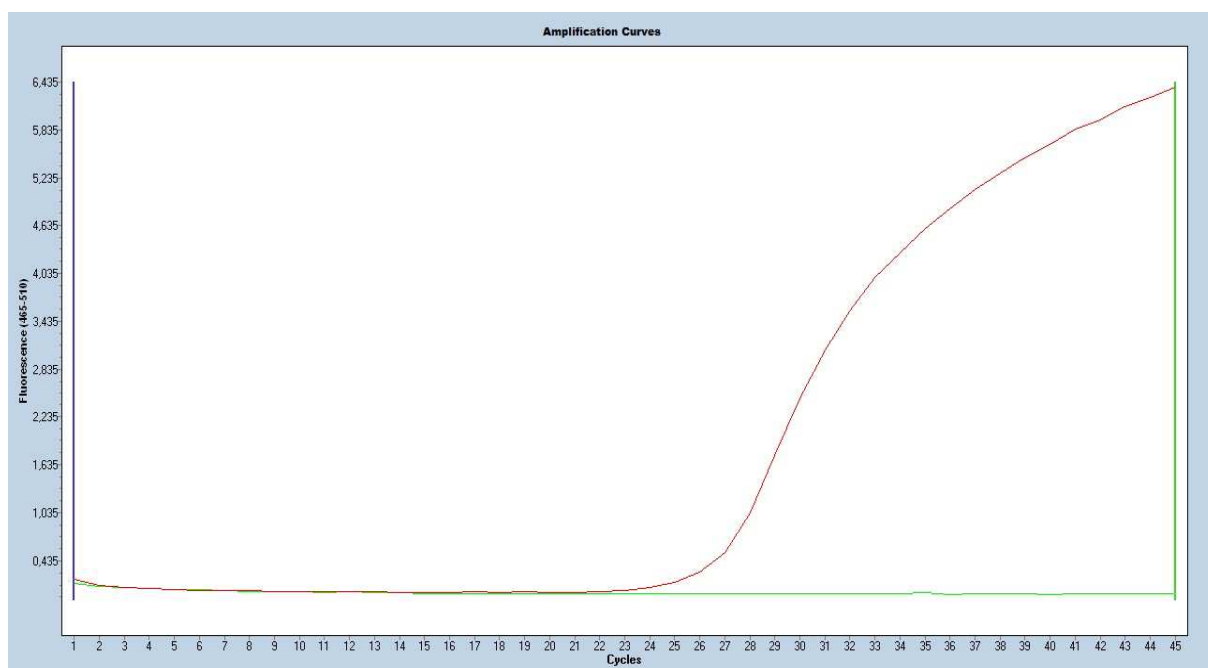
<sup>\*1</sup> Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

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
<b>Roche LightCycler® 2.0</b>	Efficienza	1,9 – 2,1
	Pendenza	-3,1 – -3,6
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	Efficienza	1,9 – 2,1
	Pendenza	-3,1 – -3,6
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	Rsq	>0,98
	Pendenza	-3,1 – -3,6
<b>ABI 7500</b>	R <sup>2</sup>	>0,98
	Pendenza	-3,1 – -3,6
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	R <sup>2</sup>	>0,98
	Pendenza	-3,1 - -3,6
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	R <sup>2</sup>	>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 <sup>2</sup>

\* 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](mailto: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).

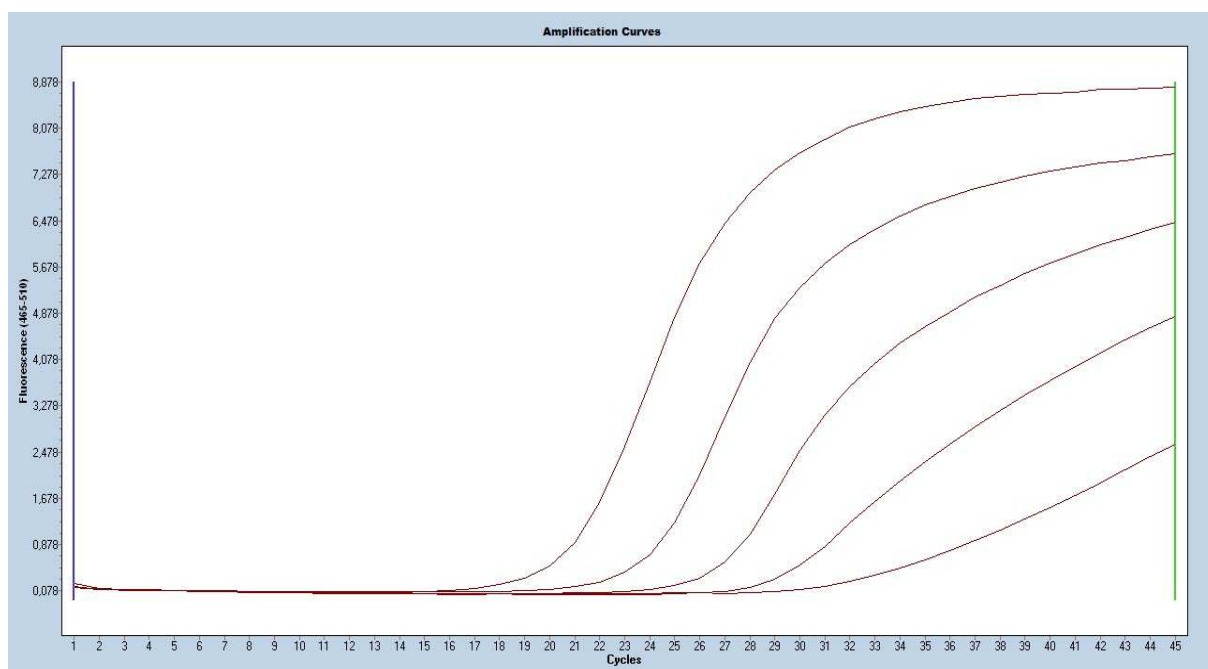


## 13. Prestazioni e caratteristiche

### 13.1 Sensibilità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup> GENE *Faecalibacterium prausnitzii* ha un limite di rivelazione  $\geq 10$  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  $\mu\text{l}$ ) su LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Fig. 2:** Serie di diluizioni di *Faecalibacterium prausnitzii* ( $10^6 - 10^2$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) su LightCycler<sup>®</sup> 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.