

MutaPLEX® AKM/FAEP

real time PCR kit

*Test für den quantitativen in-vitro-Nachweis der DNA von
Akkermansia muciniphila und
Faecalibacterium prausnitzii in klinischen Proben*

*Test for the quantitative in vitro detection of
DNA of Akkermansia muciniphila and
Faecalibacterium prausnitzii in clinical specimens*

Gültig ab / Valid from 2018-04-03



KG1911-96
KG1911-384



96/384



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1	VERWENDUNGSZWECK	2
2	EINLEITUNG	2
3	TESTPRINZIP	3
4	INHALT DER TESTPACKUNG	3
5	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
6	TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT	4
7	WICHTIGE HINWEISE	4
8	ALLGEMEINE HINWEISE	4
9	PROBENMATERIAL	5
10	PROBENVORBEREITUNG	5
11	KONTROLL-DNA	5
	<i>DNA-Isolation aus klinischen Proben</i>	<i>6</i>
12	REAL-TIME-PCR	6
	12.1 <i>Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	<i>6</i>
	12.2 <i>Durchführung</i>	<i>6</i>
	12.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	<i>7</i>
13	VALIDIERUNGSDATEN	8
14	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	9
15	PROBENQUANTIFIZIERUNG	11
16	EINSCHRÄNKUNGEN	12
17	PROBLEMBEHANDLUNG	12
18	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	14
19.	LITERATUR	15

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR-Kit dient dem quantitativen Nachweis der DNA von *Akkermansia muciniphila* und *Faecalibacterium prausnitzii* in klinischen Proben (Stuhlproben) mittels Real-time-Mikrotiterplattensystemen. Mithilfe des quantitativen MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR-Kits kann der DNA-Gehalt der untersuchten Bakterien als Kopienzahl pro Reaktion (*copy number per reaction*) bestimmt werden.

2 EINLEITUNG

Akkermansia muciniphila ist ein gramnegatives, strikt anaerobes, unbewegliches, nicht-sporenbildendes, ovales Bakterium. Es kann Mucin als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle verarbeiten, kann unter anaeroben Bedingungen auf aus dem Gastrointestinaltrakt stammendem Mucin kultiviert werden, und ist fähig, den Gastrointestinaltrakt verschiedener Spezies zu kolonisieren. Es wird vermutet, dass *Akkermansia muciniphila* im Menschen antiinflammatorische Effekte hervorruft, und Studien zeigten eine inverse Korrelation zwischen der Kolonisation durch *Akkermansia muciniphila* und Entzündungsgeschehen wie Blinddarmentzündung und Reizdarm. Forschungen ergaben, dass *Akkermansia muciniphila* zur Bekämpfung von Fettleibigkeit und Typ-2-Diabetes eingesetzt werden könnte. 3–5 % der normalen humanen Darmflora bestehen aus *Akkermansia muciniphila*, doch die Häufigkeit fällt mit steigender Fettleibigkeit. Es wird vermutet, dass die Aufnahme des Bakteriums über die Nahrung die Dicke der Darmwände durch Erhöhung des Mucinantehils vergrößert, was die Aufnahme von Nahrung durch den Körper verringert. Die Häufigkeit von *Akkermansia muciniphila* korrespondiert mit einer Verringerung von Entzündungsgeschehen, was auf eine Verbindung zwischen Nahrungsfetten, der Zusammensetzung der Darmflora und Entzündungsgeschehen hinweist.

Faecalibacterium ist eine Familie gramnegativer Bakterien. Der einzig bekannte Vertreter, *Faecalibacterium prausnitzii*, ist einer der häufigsten und wichtigsten Kommensalen der menschlichen Darmflora. Es produziert durch die Fermentation von Ballaststoffen Butyrat und andere kurzkettigen Fettsäuren. In gesunden Erwachsenen stellt *Faecalibacterium prausnitzii* mit mehr als 5 % der Darmflora eines der häufigsten Darmbakterien dar. Geringere Vorkommen von *Faecalibacterium prausnitzii* im Darm wurden mit Morbus Crohn, Fettleibigkeit, Asthma und Depression in Verbindung gebracht.

3 TESTPRINZIP

Der MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR-Kit enthält spezifische Primer und Fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden für die Amplifikation und Detektion der DNA von *Akkermansia muciniphila* und *Faecalibacterium prausnitzii* in klinischen Proben.

Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der erregerspezifischen Fluoreszenzsonden. Die pathogen-spezifische Detektion erfolgt im FAM- (*Faecalibacterium prausnitzii*) bzw. Cy5-Kanal (*Akkermansia muciniphila*).

Zusätzlich verfügt der MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR-Kit über eine Kontroll-DNA, die während der Extraktion zugefügt und in einem zweiten Amplifikationssystem nachgewiesen wird. Dies ermöglicht zum Einen das Aufdecken von Fehlern bei der DNA-Extraktion, zum Anderen kann eine mögliche Inhibition der RT-PCR identifiziert werden. Dadurch wird das Risiko von falsch negativen Ergebnissen reduziert. Die Detektion der DNA-Extraktionskontrolle erfolgt im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal.

4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 (KG1911-96) bzw. 384 (KG1911-384) Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR-Kits

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		96	384
Reaction Mix	gelb	1 x 1536 µl	4 x 1536 µl
Positive Control	rot	1 x 100 µl	
Negative Control	grün	1 x 100 µl	
Control DNA	transparent	1 x 480 µl	4 x 480 µl
Standard 1	schwarz	1 x 100 µl	einmal pro Charge*
Standard 2	violett	1 x 100 µl	
Standard 3	orange	1 x 100 µl	

* Standards (ausreichend für 25 Standardkurven) können unter der Artikelnummer KG1911-STD separat bestellt werden

5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- DNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, oder das magnetpartikelbasierte System NukEx® Complete Mag RNA/DNA, KG1020)

- Steriles Wasser, geeignet für PCR-Anwendung
- Sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Real-time-PCR-Gerät
- optische PCR-Gefäße mit Deckel oder Platten mit Folie
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR-Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei -20°C zu lagern. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal sechs Monate bei 2–8°C haltbar. Bis zu 20 Frier-Tau-Zyklen sind möglich.

Schützen Sie den Test während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

7 WICHTIGE HINWEISE

- Die MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der *Good Laboratory Practice* (GLP) sind einzuhalten.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.

8 ALLGEMEINE HINWEISE

- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.

- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.

9 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist DNA, die aus klinischen Proben (Stuhlproben) isoliert wurde.

10 PROBENVORBEREITUNG

Die MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR ist geeignet für den Nachweis der DNA von *Akkermansia muciniphila* und *Faecalibacterium prausnitzii*, die zuvor aus mit Hilfe geeigneter Methoden aus klinischen Proben isoliert wurde. Kommerziell erhältliche Extraktionskits können zur DNA-Isolierung verwendet werden. Immundiagnostik empfiehlt MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038) oder das magnetpartikelbasierte System NukEx® Complete Mag RNA/DNA (KG1020).

Wichtig: Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Probe behandelt werden.

Beachten Sie bitte auch Kapitel 11 (Kontroll-DNA).

Falls die Real-time-PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die DNA-Extrakte entsprechend den Angaben des DNA-Extraktionskitherstellers aufbewahrt werden.

11 KONTROLL-DNA

Der MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR enthält eine Kontroll-DNA, die zum einen als DNA-Extraktionskontrolle dient, zum anderen als interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der Real-time-PCR aufzeigt.

DNA-Isolation aus klinischen Proben

Kontroll-DNA als Extraktionskontrolle

MutaPLEX® AKM/FAEP Kontroll-DNA zur DNA-Extraktion geben.

5 µl Kontroll-DNA zu jeder Extraktion zugeben (5 µl x (N+1)), gut mischen. Führen Sie die DNA-Isolation gemäß der Anleitung des Herstellers durch.

Die Kontroll-DNA muss dem Lysepuffer des Extraktionskits zugesetzt werden.

12 REAL-TIME-PCR

12.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Wichtige Hinweise“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Alle Reagenzien müssen komplett aufgetaut, gemischt und kurz anzentrifugiert werden.
- Für die Quantifizierung von *Akkermansia-muciniphila*- und *Faecalibacterium-prausnitzii*-positiver DNA in klinischen Proben muss eine Standardkurve aus den Standards 1, 2 und 3 verwendet werden. Die Standardkurve muss separat auf dem Real-time-PCR-Gerät abgespeichert werden. Sie kann bei weiteren PCR-Analysen mit derselben Kitcharge verwendet werden.

Hinweis: die Standardkurve wird einmal pro Charge benötigt.

- Wir empfehlen, die Reagenzien stets in einem Kühlblock (+2 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

12.2 Durchführung

Die Kontroll-DNA wurde bereits zur DNA-Extraktion zugegeben (siehe Kapitel 11 „Kontroll-DNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 2 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 2: Herstellung des Master-Mix (Kontroll-DNA wurde während der DNA-Extraktion zugefügt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)

Ansetzen der Real-time-PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den Kühlblock des Real-time-PCR-Geräts stellen.
- 16 µl des Master-Mix in jedes Gefäß pipettieren.
- 4 µl der DNA-Eluats (inklusive des Eluats der Wasserkontrolle), die Positivkontrolle und die Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße pipettieren (Tabelle 3).
- 4 µl Standard 1, 2 und 3 in die jeweiligen Gefäße bzw. die jeweilige Vertiefung der Platte pipettieren
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 3: Ansetzen der Real-time-PCR

Komponente	Volumen
Master-Mix	16,0 µl
Probe	4,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

12.3 Geräteeinstellungen

Nutzen Sie für die Real-time-PCR ist das in Tabelle 4 beschriebene Temperaturprofil.

Tabelle 4: Real-time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1
DNA-Amplifikation			45
Denaturierung	10 s	95 °C	
Annealing und Verlängerung	40 s	60 °C	
Messung am Ende dieses Schrittes			

Die MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR wurde für das LightCycler® 480 II Real-time-PCR-Gerät entwickelt. Die Geräteeinstellungen müssen gemäß Tabelle 5 eingestellt werden.

Tabelle 5: Überblick über die für die MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR benötigten Geräteeinstellungen

Real-time-PCR-Gerät	Parameter	Detektkanal	Bemerkungen		
LightCycler® 480II	<i>F. prausnitzii</i> - <i>Control DNA</i> <i>A. muciniphila</i>	FAM (465–510) ROX (533–610) HEX (533–580) CY5 (618–660)	Colour-Compensation-Kit nicht benötigt		
			Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time [s]
			1	10	1
			1	10	2
			1	10	2
1	10	3			

Hinweis: Für die Standards 1, 2 und 3 muss die Gesamtkopienzahl pro Reaktion in der Setup-Datei des LightCycler®-480-II-Geräts angegeben werden. 4 µl pro Standard-DNA werden eingesetzt, was in den folgenden Konzentrationen resultiert:

- Standard 1: 1×10^6 Kopien/Reaktion
- Standard 2: 1×10^4 Kopien/Reaktion
- Standard 3: 1×10^2 Kopien/Reaktion

13 VALIDIERUNGSDATEN

Negativkontrollen

Alle Negativkontrollen sollten unter dem Grenzwert liegen. Im Falle einer möglichen Kontamination (Aufreten einer Kurve in der Negativkontrolle oder einer Anhäufung von Kurven in Proben mit hohem CT, beispielsweise über 36) sind die erhaltenen Ergebnisse nicht interpretierbar und der gesamte Lauf (inklusive der Extraktion) muss wiederholt werden.

Positivkontrollen

Alle Positivkontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Die Positivkontrollen müssen unter einen CT-Wert von 30 fallen.

Extraktionskontrollen

Alle internen Kontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Der CT-Wert der internen Kontrolle muss unter 35 liegen. Falls der CT-Wert der Extraktionskontrolle über 35 liegt, deutet dies auf ein DNA-Aufreini-

gungsproblem oder eine stark positive Probe hin, welche die Extraktionskontrolle inhibieren kann. In letzterem Fall ist das Testergebnis valide. Falls eine Wasserkontrolle durchgeführt wurde, muss der CT-Wert der Extraktionskontrolle unter 33 liegen.

Die Positiv- und Negativkontrolle enthalten keine Kontroll-DNA. Daher wird kein Amplifikationssignal detektiert.

Standards 1, 2 und 3

Alle Standards müssen eine positive, d. h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Der benötigte CT-Wert für Standards 1, 2 und 3 sind auf dem Analysenzertifikat angegeben.

14 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die *Faecalibacterium-prausnitzii*-spezifische Amplifikation wird im FAM-, die *Akkermansia-muciniphila*-spezifische Amplifikation im Cy5-Kanal gemessen. Die Amplifikation der Kontroll-DNA wird im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal gemessen.

Die folgenden Ergebnisse können auftreten:

- **Im FAM- und/oder Cy5-Kanal wird ein Signal detektiert:**

Das Ergebnis ist positiv, die Probe enthält bakterielle DNA.

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal nicht notwendig, da eine hohe bakterielle DNA-Konzentrationen zu einem verminderten bzw. fehlenden Fluoreszenzsignal der Kontroll-DNA führen kann (Kompetition).

- **Im FAM- und/oder Cy5-Kanal wird kein Signal detektiert, jedoch im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal:**

Das Ergebnis ist negativ, die Probe enthält keine bakterielle DNA.

Das detektierte Signal der Kontroll-DNA schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften DNA-Extraktion oder einer Real-time-PCR-Inhibition aus. Unterscheidet sich der CT-Wert der Wasserkontrolle stark von dem der Probe, so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht erkannt werden (siehe Kapitel „Problembehandlung“).

- **Weder im FAM- und/oder Cy5- noch im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal wird ein Signal detektiert:**

Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden.

Die Real-time-PCR wurde inhibiert oder es trat ein Fehler bei der DNA-Extraktion auf.

Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen Beispiele für positive und negative Real-time-PCR-Ergebnisse.

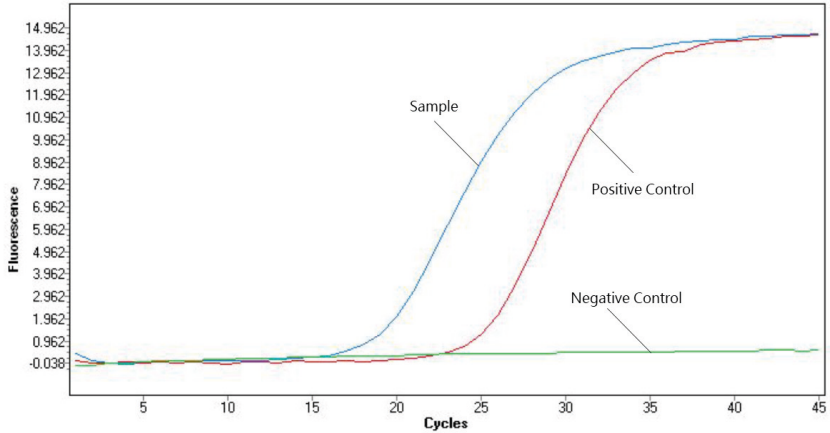


Abb. 1: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im bakterienspezifischen FAM-/Cy5-Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

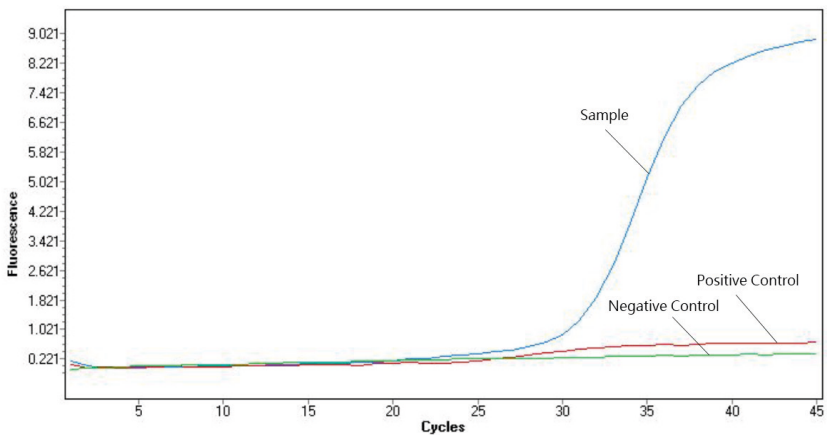


Abb. 2: Im Kontroll-DNA-spezifischen VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal wird ein Signal detektiert. Die Positiv- und Negativkontrolle enthalten keine Kontroll-DNA, weswegen kein Amplifikationssignal nachgewiesen wird.

15 PROBENQUANTIFIZIERUNG

Für die Quantifizierung von *Akkermansia-muciniphila*- und *Faecalibacterium-prausnitzii*-positiver DNA in klinischen Proben muss eine Standardkurve aus den Standards 1, 2 und 3 verwendet werden. Die Standardkurve muss separat auf dem Real-time-PCR-Gerät abgespeichert werden. Sie kann bei weiteren PCR-Analysen mit derselben Kitcharge verwendet werden.

Hinweis: die Standardkurve wird einmal pro Charge benötigt.

Mithilfe des quantitativen MutaPLEX® AKM/FAEP Real-time-PCR-Kits kann der DNA-Gehalt der untersuchten Bakterien als Kopienzahl pro Reaktion (*copy number per reaction*) bestimmt werden. Anschließend wird der Korrekturfaktor K verwendet, um das Ergebnis von Kopienzahl pro Reaktion in Bakterien/g Stuhl umzurechnen. Der Korrekturfaktor berücksichtigt die Verdünnung durch die DNA-Extraktion (unabhängig vom verwendeten DNA-Extraktions-Kit), die Verdünnung der PCR und die Anzahl der Zielsequenzen im Gesamtgenom von *Akkermansia muciniphila* und *Faecalibacterium prausnitzii*. Für die Übertragung des PCR-Ergebnisses in Bakterienlast der Probe wird die folgende Formel verwendet:

$$n_{A. muciniphila} (\text{Zellen/g}_{\text{Stuhl}}) = n_{LC480} (\text{Kopien/Reaktion}) * K_{A. muciniphila} (1/\text{g})$$

$$n_{F. prausnitzii} (\text{Zellen/g}_{\text{Stuhl}}) = n_{LC480} (\text{Kopien/Reaktion}) * K_{F. prausnitzii} (1/\text{g})$$

n_{LC480} (Kopien/Reaktion) Errechnete Kopienzahl pro Reaktion für das PCR-Gerät, basierend auf CT-Wert und Standardkurve.

Die Berechnung des Korrekturfaktors K benötigt die folgenden Parameter:

m_{Probe} [g]	Masse der Stuhlprobe
b_{Puffer}	Verdünnungsfaktor des Transport- und Lagerungspuffers
$c_{\text{Extraktion}}$	Korrekturfaktor für die Extraktion
V_{Eluat} [µl]	Eluat-Gesamtvolumen
a_{Eluat}	Eluat-Verdünnungsfaktor
$1/(4[\mu\text{l}])$	In der PCR-Reaktion verwendetes Volumen
$1/(\text{Zielkopien})$	Kopien des Zielgens pro Genom; in <i>A. muciniphila</i> sind es 3, in <i>F. prausnitzii</i> 6 Kopien des verwendeten Zielgens

$$K_{A. muciniphila} (1/\text{g}) = \frac{1/(m_{\text{Probe}} [\text{g}] * b_{\text{Puffer}} * c_{\text{Extraktion}} * V_{\text{Eluat}} [\mu\text{l}] * a_{\text{Eluat}} * 1/(4[\mu\text{l}]])}{1/(\text{Zielkopien})}$$

$$K_{F. prausnitzii} (1/\text{g}) = \frac{1/(m_{\text{Probe}} [\text{g}] * b_{\text{Puffer}} * c_{\text{Extraktion}} * V_{\text{Eluat}} [\mu\text{l}] * a_{\text{Eluat}} * 1/(4[\mu\text{l}]])}{1/(\text{Zielkopien})}$$

Tabelle 6: Beispiel der Berechnung des Korrekturfaktors K für *Akkermansia muciniphila*

	Beschreibung	Faktor
$1/(m_{\text{Sample}} [\text{g}])$	200 mg Stuhlprobe in 1 ml Puffer	x 5
b_{Buffer}	250 μl Stuhlprobenpuffer (inkl. Dichtefaktor)	x 2.552
$c_{\text{Extraction}}$	Korrekturfaktor für die Extraktion	x 50
$V_{\text{Eluat}} [\mu\text{l}]$	Volumen des Eluats	x 100
a_{Eluat}	Verdünnung des Eluats	x 10
$1/(4[\mu\text{l}])$	4 μl PCR-Probenvolumen	x 1/4
$1/(\text{target copies})$	3 Kopien des Zielgens pro Genom	x 1/3
$K_{A.\text{muciniphila}} (1/\text{g})$	Korrekturfaktor für die Quantifizierung	5.32×10^4

Tabelle 7: Beispiel der Berechnung des Korrekturfaktors K für *Faecalibacterium prausnitzii*

	Beschreibung	Faktor
$1/(m_{\text{Sample}} [\text{g}])$	200 mg Stuhlprobe in 1 ml Puffer	x 5
b_{Buffer}	250 μl Stuhlprobenpuffer (inkl. Dichtefaktor)	x 2.552
$c_{\text{Extraction}}$	Korrekturfaktor für die Extraktion	x 50
$V_{\text{Eluat}} [\mu\text{l}]$	Volumen des Eluats	x 100
a_{Eluat}	Verdünnung des Eluats	x 10
$1/(4[\mu\text{l}])$	4 μl PCR-Probenvolumen	x 1/4
$1/(\text{target copies})$	6 Kopien des Zielgens pro Genom	x 1/6
$K_{F.\text{prausnitzii}} (1/\text{g})$	Korrekturfaktor für die Quantifizierung	2.66×10^4

16 EINSCHRÄNKUNGEN

Die Ergebnisse müssen stets im Kontext der klinischen Symptome betrachtet werden. Therapeutische Entscheidungen sollten unter Berücksichtigung klinischer Daten getroffen werden.

17 PROBLEMBEHANDLUNG

Die folgenden Problembeschreibungen sollen bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-time-PCR behilflich sein.

Kein Fluoreszenzsignal im FAM- oder Cy5-Kanal der Positivkontrollen

Der gewählte entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen Kanal

Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der *Faecalibacterium-prausnitzii*-spezifischen Amplifikation, den Cy5-Kanal für die der *Akkermansia-muciniphila*-spezifischen Amplifikation und den VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-DNA .

Fehlerhaftes Ansetzen der Real-time-PCR

Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den im Kapitel „Durchführung“ beschriebenen Schritten.

Fehlerhaftes Real-time-PCR-Temperaturprofil

Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (Tabelle 4).

Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Schwaches oder kein Signal der Kontroll-DNA und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM- oder Cy5-Kanal

Die Real-time-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein

Überprüfen Sie die Real-time-PCR-Bedingungen (Tabelle 4).

Real-time-PCR-Inhibition

Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe Kapitel „Probenvorbereitung“). Beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden (ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei hoher Geschwindigkeit vor der DNA-Elution wird empfohlen).

Verlust der DNA während des Aufarbeitungsprozesses

Falls die Kontroll-DNA vor der Extraktion zugefügt wurde, kann das Ausbleiben des Signals auf eine fehlerhafte DNA-Extraktion hinweisen. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden und beachten Sie die Herstellerangaben.

Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum


















Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Detektion eines Signals im FAM- oder Cy5-Kanal der Negativkontrolle

Kontamination des Real-time-PCR-Ansatzes

Wiederholen Sie die Real-time-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Falls sich das Ergebnis wiederholt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die Real-time-PCR mit einem neuen Kit.

18 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

DNA	Desoxyribonukleinsäure		Zu verwenden mit
CT	<i>Cycle threshold</i>		Katalognummer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		Inhalt ausreichend für <n> Tests
	Reaktionsmix		Obere Temperaturgrenze
	Positivkontrolle		Hersteller
	Negativkontrolle		Verwendbar bis
	Kontroll-DNA		Gebrauchsanweisung beachten
	Standard 1		Chargennummer
	Standard 2		Inhalt
	Standard 3		<i>In-vitro</i> -Diagnostikum

19. LITERATUR

1. Cao Y, Shen J, Ran Z. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. *Gastroenterology Research and Practice*. 2014; Article ID 872725.
2. Collado C, Derrien M, Isolauri E, de Vos W, Salminen S. Intestinal Integrity and *Akkermansia muciniphila*, a Mucin-Degrading Member of the Intestinal Microbiota Present in Infants, Adults, and the Elderly. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007 Dec; 77:67-7770.
3. Dibaise J, Zhang H, Crowell M, Krajmalnik-Brown R, Decker A, Rittmann B. Gut Microbiota and Its Possible Relationship with Obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008; 83/4, 460-469.
4. Ettinger G, MacDonald K, Reid G, Burton J. The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut Microbes* 2014 Nov/Dec; 5/6, 719-728.

MutaPLEX® AKM/FAEP

real time PCR kit

*Test for the quantitative in vitro detection of
DNA of Akkermansia muciniphila and
Faecalibacterium prausnitzii in clinical specimens*

Valid from 2018-04-03



KG1911-96
KG1911-384



96/384



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1	INTENDED USE	19
2	PATHOGEN INFORMATION	19
3	PRINCIPLE OF THE TEST	19
4	PACKAGE CONTENTS	20
5	EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER	20
6	TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	21
7	IMPORTANT NOTES	21
8	GENERAL PRECAUTIONS	21
9	SAMPLE MATERIAL	21
10	SAMPLE PREPARATION	22
11	CONTROL DNA	22
	<i>DNA isolation from clinical specimens</i>	22
12	REAL TIME PCR	22
	12.1 <i>Important points before starting</i>	22
	12.2 <i>Procedure</i>	23
	12.3 <i>Instrument settings</i>	24
13	ASSAY VALIDATION	25
14	DATA ANALYSIS	26
15	QUANTIFICATION OF SAMPLES	28
16	LIMITATIONS OF THE METHOD	29
17	TROUBLESHOOTING	29
18	ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	31
19.	LITERATURE	32

1 INTENDED USE

The MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR kit is an assay for the quantitative detection of DNA of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in clinical specimens (stool samples) using real time PCR microplate systems. Using the quantitative MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR, the DNA content of the respective bacteria can be determined as copy number per reaction.

2 PATHOGEN INFORMATION

Akkermansia muciniphila is a gram-negative, strictly anaerobic, non-motile, non-spore-forming, oval-shaped bacterium. *A. muciniphila* is able to use mucin as its sole source of carbon and nitrogen, is culturable under anaerobic conditions on medium containing gastric mucin, and is able to colonise the gastrointestinal tracts of a number of animal species. *A. muciniphila* is believed to have anti-inflammatory effects in humans, and studies have shown inverse relationships between *A. muciniphila* colonisation and inflammatory conditions such as appendicitis or irritable bowel syndrome. Researchers have discovered that *A. muciniphila* may be able to be used to combat obesity and type 2 diabetes. The bacterium is naturally present in the human digestive tract at 3–5%, but has been seen to fall with obesity. It is thought that eating the bacterium increases the gut wall thickness, with the addition of mucin, which will block food from being absorbed by the body. *A. muciniphila* corresponded to a reduction in inflammation, indicating a link between dietary fats, gut flora composition, and inflammation levels.

Faecalibacterium is a genus of gram-negative bacteria. Its sole known species, *Faecalibacterium prausnitzii*, is one of the most abundant and important commensal bacteria of the human gut microbiota. These bacteria produce butyrate and other short-chain fatty acids through the fermentation of dietary fiber. In healthy adults, *Faecalibacterium prausnitzii* represent more than 5% of the bacteria in the intestine, making it one of the most common gut bacteria. It boosts our immune system, and many other things. Lower than usual levels of *F. prausnitzii* in the intestines have been associated with Crohn's Disease, obesity, asthma and Major Depressive Disorder.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR kit contains specific primers and dual-labelled probes for the amplification and detection of DNA of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in clinical specimens. The presence of nucleic acid is detected by an increase in fluorescence due to hydrolysis of the probes during amplification. The emitted fluorescence is measured in the FAM channel (*Faecalibacterium prausnitzii*) and Cy5 channel (*Akkermansia muciniphila*).

Furthermore, MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR kit contains a control DNA, which is added during DNA extraction and detected in the same reaction by a differently labelled probe.

The control DNA allows the detection of PCR inhibition and acts as control for the isolation of the nucleic acid from the clinical specimen.

The fluorescence of the control DNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

4 PACKAGE CONTENTS

The reagents supplied are sufficient for 96 (KG1911-96) or 384 (KG1911-384) reactions, respectively.

Table 1: Components of the MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR kit .

Label	Lid Colour	Content	
		96	384
Reaction Mix	yellow	1 x 1536 µl	4 x 1536 µl
Positive Control	red	1 x 100 µl	
Negative Control	green	1 x 100 µl	
Control DNA	colourless	1 x 480 µl	4 x 480 µl
Standard 1	black	1 x 100 µl	once per lot*
Standard 2	purple	1 x 100 µl	
Standard 3	orange	1 x 100 µl	

* Standards (sufficient for 25 standard curves) can be ordered separately using the article no KG1911-STD

5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- DNA isolation kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, or the magnet particle based system NukEx® Complete Mag RNA/DNA, KG1020)
- PCR grade water
- Sterile microtubes
- Pipets (adjustable volume)
- Sterile pipet tips with filter
- Table centrifuge
- Vortex
- Real time PCR instrument
- Optical PCR reaction tubes with lid or reaction plates with foil
- Optional: Liquid handling system for automation

6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR-Kit is shipped on dry ice. All components must be stored at maximum -20 °C in the dark immediately after receipt. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package.

Up to 20 freeze and thaw cycles are possible.

For convenience, opened reagents can be stored at 2–8 °C for up to 6 months.

Protect kit components from direct sunlight during the complete test run.

7 IMPORTANT NOTES

- The MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR must be performed by qualified personnel only.
- Good Laboratory Practice (GLP) has to be applied.
- Clinical samples must always be regarded as potentially infectious material and all equipment used has to be treated as potentially contaminated.

8 GENERAL PRECAUTIONS

- Stick to the protocol described in the instructions for use.
- Set up different laboratory areas for the preparation of samples and for the set up of the PCR in order to avoid contaminations.
- Pipettes, tubes and other materials must not circulate between those different laboratory areas.
- Always use filter tips.
- Regularly decontaminate equipment and benches with ethanol-free decontaminant.
- Do not combine MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR kit components of different lot numbers.

9 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR is nucleic acid isolated from clinical specimens (stool samples).

10 SAMPLE PREPARATION

The MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR is suitable for the detection of the DNA of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* isolated from clinical specimens with appropriate isolation methods.

Commercial kits for DNA isolation such as MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038) or the magnet particle based system NukEx® Complete Mag RNA/DNA (KG1020) are recommended.

Important: In addition to the samples, always run a water control in your extraction. Treat this water control analogous to a sample.

Comparing the amplification of the control DNA in the samples to the amplification of the internal control in the water control will give insights on possible inhibitions of the real time PCR. Furthermore, possible contaminations during DNA extraction will be detectable.

Please note chapter 11 “Control DNA”.

If the real time PCR is not performed immediately, store extracted DNA according to the instructions given by the DNA extraction kit’s manufacturer.

11 CONTROL DNA

A control DNA is supplied and can be used as extraction control or only as inhibition control. This allows the user to control the DNA isolation procedure and to check for possible real time PCR inhibition.

DNA isolation from clinical specimens

Control DNA used as extraction control

MutaPLEX® AKM/FAEP control DNA is added to the DNA extraction.

Add 5 µl control DNA per extraction (5 µl x (N+1)). Mix well. Perform the DNA isolation according to the manufacturer’s instructions.

The control DNA must be added to the lysis buffer of the extraction kit.

12 REAL TIME PCR

12.1 Important points before starting

- Please pay attention to chapter 7 “Important Notes”.

- Before setting up the real time PCR, familiarise yourself with the real time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the PCR set up.
- In every PCR run, one positive control and one negative control should be included.
- Before each use, all reagents should be thawed completely at room temperature, thoroughly mixed, and centrifuged very briefly.
- For quantification of *Akkermansia muciniphila*- und *Faecalibacterium prausnitzii*-positive DNA in clinical samples, a standard curve using standards 1, 2 and 3 must be applied. The standard curve needs to be saved separately on the real time PCR instrument. It can be imported and used in subsequent runs with kits of the same lot.

Note: the application of the standard curve is needed once per lot.

- We recommend to keep reagents and samples at 2–8°C (e. g. on ice or a cooling block) at all times.

12.2 Procedure

The control DNA was added during DNA extraction (see chapter 11 “Control DNA”). Prepare the master mix according to table 2.

The master mix contains all of the components needed for PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 2: Preparation of the master mix (control DNA was added during DNA extraction)

Volume per reaction	Volume master mix
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)

Real time PCR set up

- Place the number of optical PCR reaction tubes needed into the respective tray of the real time PCR instrument.
- Pipet 16 µl of the master mix into each optical PCR reaction tube.
- Add 4 µl of the eluates from the DNA isolation (including the eluate of the water control), the positive control and the negative control to the corresponding optical PCR reaction tube (table 3).

- Add 4 µl of standard 1, 2 and 3, respectively, to the corresponding optical PCR reaction tube or the respective well of the optical reaction plate (table 3)
- Close the optical PCR reaction tubes immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Table 3: Preparation of the real time PCR

Component	Volume
Master mix	16.0 µl
Sample	4.0 µl
Total volume	20.0 µl

12.3 Instrument settings

For the real time PCR use the thermal profile shown in table 4.

Table 4: real time PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	No of cycles
Initial Denaturation	5 min	95 °C	1
Amplification of DNA			45
Denaturation	10 s	95 °C	
Annealing and Extension	40 s	60 °C	
Aquisition at the end of this step			

The MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR is designated for the LightCycler® 480 II real time PCR instrument. Instrument settings have to be adjusted according to table 5.

Table 5: Overview of the instrument settings required for the MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR.

Real time PCR Instrument	Parameter	Detection channel	Notes		
LightCycler 480II	<i>F. prausnitzii</i>	FAM (465–510)	Colour Compensation Kit not required		
	-	ROX (533–610)			
	<i>Control DNA</i>	HEX (533–580)	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time [s]
	<i>A. muciniphila</i>	CY5 (618–660)	1	10	1
			1	10	2
			1	10	2
			1	10	3

Note: For standards 1, 2 and 3 the total copy number per reaction needs to be entered in the setup file of the LightCycler® 480 II instrument. 4 µl of each standard DNA are used, resulting in the following concentrations:

- Standard 1: 1 x 10⁶ copies/reaction
- Standard 2: 1 x 10⁴ copies/reaction
- Standard 3: 1 x 10² copies/reaction

13 ASSAY VALIDATION

Negative controls

All negative controls should be below the threshold. If there is a potential contamination (appearance of a curve in the negative control or a cluster of curves in specimens at high CT – for example above 36), results obtained are not interpretable and the whole run (including extraction) has to be repeated.

Positive controls

The positive control must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The positive control must fall below a CT of 30.

Extraction controls

All extraction controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The extraction control must fall below a CT of 35. If the extraction control is above CT 35, this points to a purification problem or a strong positive sample that can inhibit the EC. In the latter case, the assay is valid. If a water control run is performed, the EC must fall below a CT of 33.

Postive Control and the Negative Control do not contain Control DNA. Therefore, no amplification signal is detected.

Standards 1, 2 and 3

All standards must show a positive (i. e. exponential) amplification curve.

Standards 1, 2, 3 must show a CT: see certificate of analysis.

14 DATA ANALYSIS

The *Faecalibacterium prausnitzii*-specific amplification is measured in the FAM channel, and the *Akkermansia muciniphila*-specific amplification in the Cy5 channel.

The amplification of the control DNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

The following results can occur:

- **A signal in the FAM and/or Cy5 channel is detected:**

The result is positive, the sample contains bacterial DNA.

In this case, detection of a signal of the control DNA in the VIC®/HEX/JOE/TET channel is inessential, as high concentrations of bacterial DNA may reduce or completely inhibit amplification of the control DNA .

- **No signal in the FAM and/or Cy5 channel, but a signal in the VIC®/HEX/JOE/TET channel is detected:**

The result is negative, the sample does not contain bacterial DNA.

The signal of the control DNA excludes the possibilities of DNA isolation failure and/or real time PCR inhibition. If the CT value of a sample differs significantly from the CT value of the water control, a partial inhibition occurred, which can lead to negative results in weak positive samples (see „Troubleshooting“).

- **Neither in the FAM and/or Cy5 nor in the VIC®/HEX/JOE/TET channel a signal is detected:**

A diagnostic statement cannot be made.

The DNA isolation was not successful or an inhibition of the PCR has occurred.

Figure 1 and figure 2 show examples for positive and negative real time PCR results.

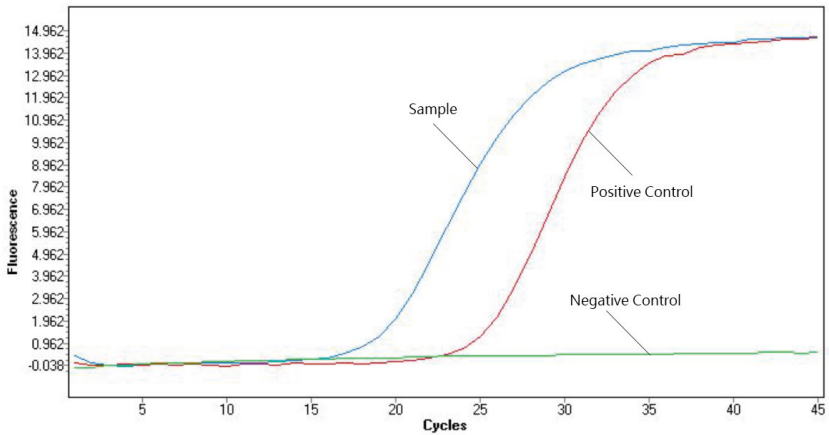


Figure 1: The positive sample shows bacteria-specific amplification in the FAM/Cy5 channel, whereas no fluorescence signal is detected in the negative control.

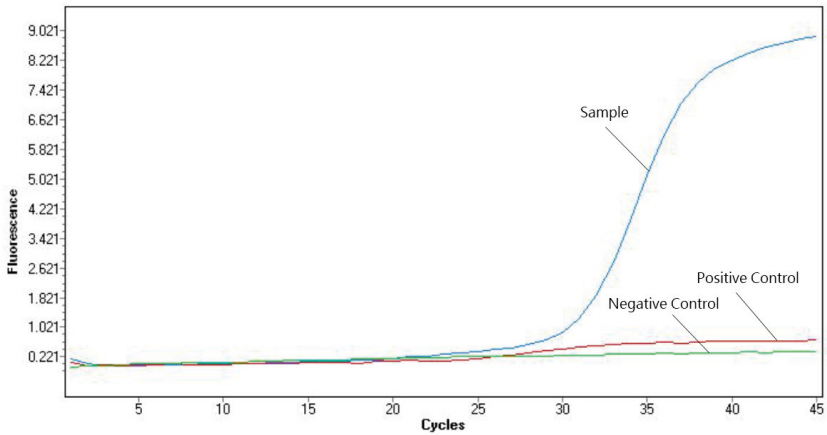


Figure 2: The sample shows a signal in the control DNA-specific VIC®/HEX/JOE/TET channel. The positive control and the negative control do not contain control DNA. Therefore, no amplification signal is detected.

15 QUANTIFICATION OF SAMPLES

For quantification of *Akkermansia muciniphila*- and *Faecalibacterium prausnitzii*-positive DNA in clinical samples, a standard curve using standards 1, 2 and 3 must be applied. The standard curve needs to be saved separately on the real time PCR instrument. It can be imported and used in subsequent runs with kits of the same lot.

Note: the application of the standard curve needed once per each lot.

Using the quantitative MutaPLEX® AKM/FAEP real time PCR, the DNA content of the respective bacteria are determined in copy number per reaction. Using correction factor K, the translation of copies/reaction to bacteria/g feces is made. The correction factor considers the dilution of the DNA extraction (dependent on the respective DNA extraction kit), the dilution of the PCR and the number of target sequences in the whole genome of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii*. For translation of the result of the PCR into bacterial load of the sample, the following formula is used:

$$n_{A. muciniphila} (\text{cells/g}_{\text{feces}}) = n_{LC480} (\text{copies/reaction}) * K_{A. muciniphila} (1/\text{g})$$

$$n_{F. prausnitzii} (\text{cells/g}_{\text{feces}}) = n_{LC480} (\text{copies/reaction}) * K_{F. prausnitzii} (1/\text{g})$$

n_{LC480} (copies/reaction) Calculated copy number per reaction by PCR Instrument, based on the CT value and the standard curve.

The calculation of the correction factor K requires the following parameters:

m_{Sample} [g]	Mass of the stool sample
b_{Buffer}	Dilution factor of the transport and storage buffer
$c_{\text{Extraction}}$	Correction factor for the extraction
V_{Eluate} [μl]	Total Eluate volume
a_{Eluate}	Dilution factor of the eluate
$1/(4[\mu\text{l}])$	Amount of μl used in the PCR reaction
$1/(\text{target copies})$	Copies of target gene per genome ; the target genes are 3 times present in <i>A. muciniphila</i> and 6 times in <i>F. prausnitzii</i> .

$$K_{A. muciniphila} (1/\text{g}) = \frac{1/(m_{\text{Sample}} [\text{g}]) * b_{\text{Buffer}} * c_{\text{Extraction}} * V_{\text{Eluate}} [\mu\text{l}] * a_{\text{Eluate}} * 1/(4[\mu\text{l}])}{1/(\text{target copies})}$$

$$K_{F. prausnitzii} (1/\text{g}) = \frac{1/(m_{\text{Sample}} [\text{g}]) * b_{\text{Buffer}} * c_{\text{Extraction}} * V_{\text{Eluate}} [\mu\text{l}] * a_{\text{Eluate}} * 1/(4[\mu\text{l}])}{1/(\text{target copies})}$$

Table 6: Example for the calculation of correction factor K for *Akkermansia muciniphila*

	Description	Factor
$1/(m_{\text{Sample}} [\text{g}])$	200 mg stool sample in 1 ml buffer	x 5
b_{Buffer}	250 μl stool buffer (incl. factor for density)	x 2.552
$c_{\text{Extraction}}$	Correction factor for extraction	x 50
$V_{\text{Eluat}} [\mu\text{l}]$	Volume of the eluate	x 100
a_{Eluat}	Dilution of the eluate	x 10
$1/(4[\mu\text{l}])$	4 μl sample volume for PCR	x 1/4
$1/(\text{target copies})$	3 copies of target gene per genome	x 1/3
$K_{A.\text{muciniphila}} (1/\text{g})$	Correction factor for quantification	5.32×10^4

Table 7: Example for the calculation of correction factor K for *Faecalibacterium prausnitzii*

	Description	Factor
$1/(m_{\text{Sample}} [\text{g}])$	200 mg stool sample in 1 ml buffer	x 5
b_{Buffer}	250 μl stool buffer (incl. factor for density)	x 2.552
$c_{\text{Extraction}}$	Correction factor for extraction	x 50
$V_{\text{Eluat}} [\mu\text{l}]$	Volume of the eluate	x 100
a_{Eluat}	Dilution of the eluate	x 10
$1/(4[\mu\text{l}])$	4 μl sample volume for PCR	x 1/4
$1/(\text{target copies})$	6 copies of target gene per genome	x 1/6
$K_{F.\text{prausnitzii}} (1/\text{g})$	Correction factor for quantification	2.66×10^4

16 LIMITATIONS OF THE METHOD

The results must always be considered in relation to the clinical symptoms. Therapeutical consequences should be made in consideration of clinical data.

17 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a real time PCR.

No fluorescence signal in the FAM or Cy5 channel of the positive controls

The selected channel for analysis does not comply with the protocol

Select the FAM channel for analysis of the *Faecalibacterium prausnitzii*-specific amplification, the Cy5 channel for analysis of the *Akkermansia muciniphila*-specific amplification and the VIC®/HEX/JOE/TET channel for the amplification of the control DNA.

Incorrect configuration of the real time PCR

Check your work steps and compare with chapter "Procedure".

The programming of the thermal profile is incorrect

Compare the thermal profile with the protocol (table 4).

Incorrect storage conditions for one or more kit components or kit expired

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter "Transport, Storage and Stability".

Weak or no signal of the control DNA and simultaneous absence of a signal in the bacteria-specific FAM or Cy5 channel

real time PCR conditions do not comply with the protocol

Check the real time PCR conditions (table 4).

real time PCR inhibited

Make sure that you use an appropriate isolation method (see "Sample preparation") and follow the manufacturer's instructions. Make sure that the ethanol-containing washing buffer of the isolation kit has been completely removed. An additional centrifugation step at high speed is recommended before elution of the DNA.

DNA loss during isolation process

In case the control DNA was added before extraction, the lack of an amplification signal can indicate that the DNA isolation was not successful. Make sure that you use an appropriate isolation method (commercial kits are recommended) and stick to the manufacturer's protocol.

Incorrect storage conditions for one or more components or kit expired




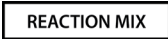













Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter “Transport, Storage and Stability”.

Detection of a fluorescence signal in the FAM or Cy5 channel of the negative control

Contamination during preparation of the PCR

Repeat the real time PCR in replicates. If the result is negative in the repetition, the contamination occurred when the samples were pipetted into the optical PCR reaction tubes. Make sure to pipet the positive control last and close the optical PCR reaction tube immediately after adding the sample. If the same result occurs, one or more of the kit components might be contaminated. Make sure that work space and instruments are decontaminated regularly. Use a new kit and repeat the real time PCR.

18 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

DNA	Deoxyribonucleid Acid		To be used with
CT	Cycle threshold		Catalog number
PCR	Polymerase chain reaction		Contains sufficient for <n> test
	Reaction Mix		Upper limit of temperature
	Positive control		Manufacturer
	Negative control		Use by
	Control DNA		Consult instructions for use
	Standard 1		Lot number
	Standard 2		Content
	Standard 3		In vitro diagnostic medical device

19. LITERATURE

1. Cao Y, Shen J, Ran Z. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. *Gastroenterology Research and Practice*. 2014; Article ID 872725.
2. Collado C, Derrien M, Isolauri E, de Vos W, Salminen S. Intestinal Integrity and *Akkermansia muciniphila*, a Mucin-Degrading Member of the Intestinal Microbiota Present in Infants, Adults, and the Elderly. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007 Dec; 77:67-7770.
3. Dibaise J, Zhang H, Crowell M, Krajmalnik-Brown R, Decker A, Rittmann B. Gut Microbiota and Its Possible Relationship with Obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008; 83/4, 460-469.
4. Ettinger G, MacDonald K, Reid G, Burton J. The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut Microbes* 2014 Nov/Dec; 5/6, 719-728.