

RIDA® GENE Gut Balance

REF PG0105



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



1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA®GENE Gut Balance est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative et quantitative directe d'ADN de *Bacteroides* et du cluster XIVa dans les échantillons de selles humaines¹.

2. Résumé et explication du test

90 % de la flore intestinale d'une personne normale comprend deux groupes phylogénétiques qui vivent dans un équilibre symbiotique. Les *Bacteroides* sont des bactéries anaérobies à Gram négatif qui font partie de la flore intestinale normale des voies intestinales. Dans le gros intestin se trouvent environ 10^{11} de *Bacteroides*/g de selles, qui sont donc les bactéries numériquement dominantes. Le second groupe phylogénétique est celui des *firmicutes*. Le cluster XIVa de *Clostridium* est une classe de *firmicutes* à laquelle appartiennent, entre autres, *Eubacterium* spp. et *Roseburia* spp.

Différentes sources associent un déséquilibre de la composition de la flore intestinale (dysbiose) à l'obésité^{2,3}. Dans ce cas, la diminution du nombre de *Bacteroides* est due à l'obésité. De même, une augmentation du nombre d'*Eubacterium rectale* a été détectée chez les patients obèses^{3,4}.

3. Principe du test

RIDA®GENE Gut Balance est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative et quantitative directe d'ADN de *Bacteroides* et du cluster XIVa dans les échantillons de selles humaines.

Après isolation de l'ADN survient l'amplification du fragment de gène (si présent) spécifique à *Bacteroides* et au cluster XIVa (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 étalons, Standard A, Standards B et Standards 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 Gut Balance 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 de la trousse

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 -16 °C et -28 °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 Gut Balance 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® 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 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 Gut Balance 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.

Le **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 l'ADN de contrôle interne **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'en ajouter 20 µl pendant la procédure d'extraction. L'ADN de contrôle interne **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 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**, le **Internal Control DNA** et les **Standard A**, **Standard B** et **Standard C** 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).

Remarque : 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. 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® 480II 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 calibre 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® 480II

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
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 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 x 10⁴ copies/réaction

Étalon C : 5 x 10⁶ 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® 480II	<i>Bacteroides</i>	465/510	Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
	Cluster XIVa	618/660	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Bacteroides</i>	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
	Cluster XIVa	Cy5	
ABI 7500	<i>Bacteroides</i>	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Bacteroides</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	Cluster XIVa	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Bacteroides</i>	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	ICD	Jaune	
	Cluster XIVa	Rouge	

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, figures 1 et 2) 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	Négative	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

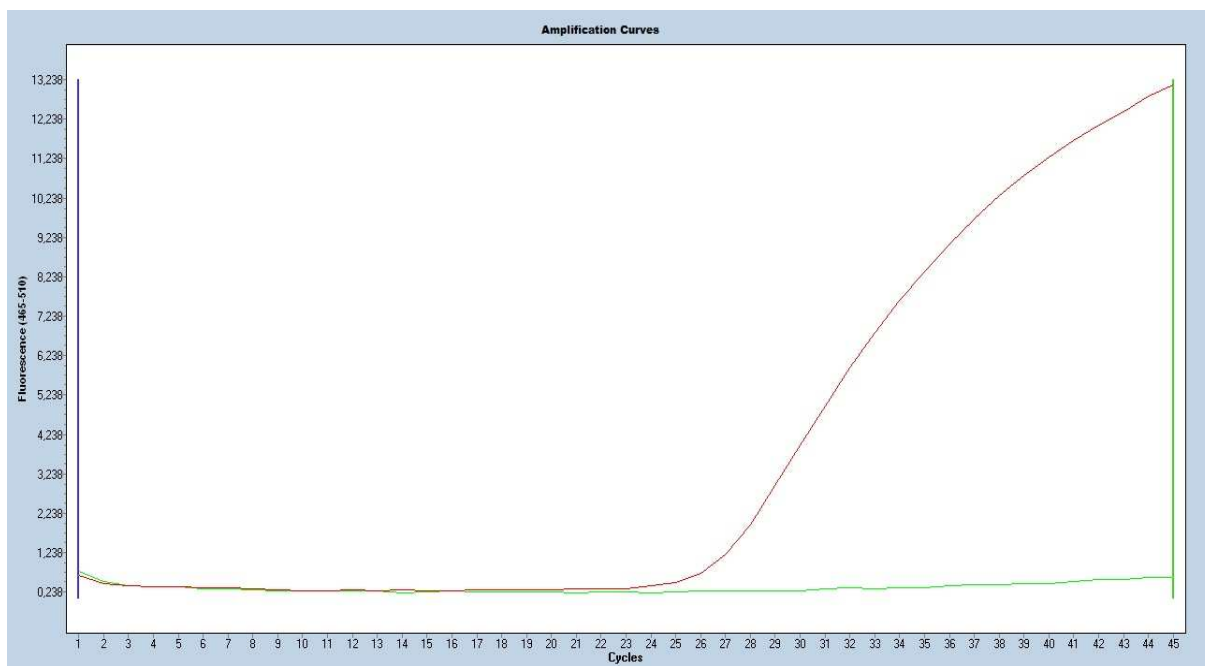


Figure 1 : Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert)
(*Bacteroides*) sur le LightCycler® 480II

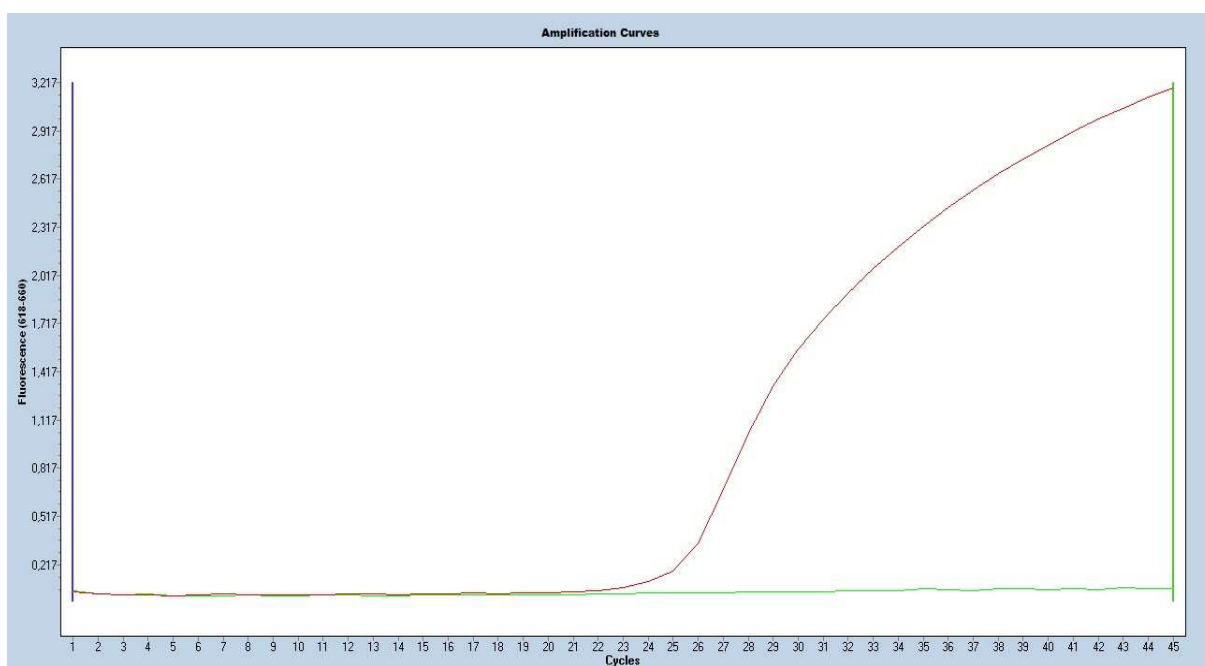


Figure 2 : Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert)
(Cluster XIVa) sur le LightCycler® 480II

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	Rsq	> 0,98
	Y	-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>Bacteroides</i>	Cluster XIV	ICD	Résultat
positif	négatif	positif/négatif	<i>Bacteroides</i> détectés*
négatif	positif	positif/négatif	Cluster XIVa détecté*
positif	positif	positif/négatif	<i>Bacteroides</i> et cluster XIVa détectés
négatif	négatif	positif	Gènes cibles non détectés*
négatif	négatif	négatif	Non valide

Un échantillon est estimé positif si l'ADN de l'échantillon et le **Internal Control DNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Un échantillon est également estimé positif 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**.

Un échantillon est estimé négatif si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour le **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 du 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 double négatif pour l'ADN de *Bacteroides* et du cluster XIVa est improbable étant donné que les deux groupes de bactéries sont des bactéries commensales de l'homme. De ce fait, cette observation vaut aussi pour un résultat négatif pour un seul des deux groupes de bactéries. En cas de résultat négatif pour l'ADN de *Bacteroides* et du cluster XIVa, 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 double

négatif pour l'ADN de *Bacteroides* et du cluster XIVa, 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 *Bacteroides* et au cluster XIVa, 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 *Bacteroides* et au cluster XIVa, 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 Gut Balance, 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 Gut Balance en cellules/g de selles est faite en utilisant la formule suivante :

C [copies/g selles] = c [copies/réaction] x 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
a. Séquence cible contenue 6x dans l'ensemble du génome de <i>Bacteroides</i> ou	a. x 0,167 (<i>Bacteroides</i>)
b. Séquence cible contenue 5x dans l'ensemble du génome du cluster XIVa	b. x 0,2 (Cluster XIVa)
Facteur de correction K pour <i>Bacteroides</i>	0,33 x 10 ²
Facteur de correction K pour le cluster XIVa	0,40 x 10 ²

* Le résultat correspond à 1 g de selles

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

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 Gut Balance.
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 Gut Balance est ≥ 10 copies d'ADN par réaction pour *Bacteroides* et le cluster XIVa.

Les figures 3 et 4 suivantes montrent une série de dilutions de *Bacteroides* et du cluster XIVa (10^6 - 10^2 copies d'ADN par μl chacune) dans le LightCycler® 480II.

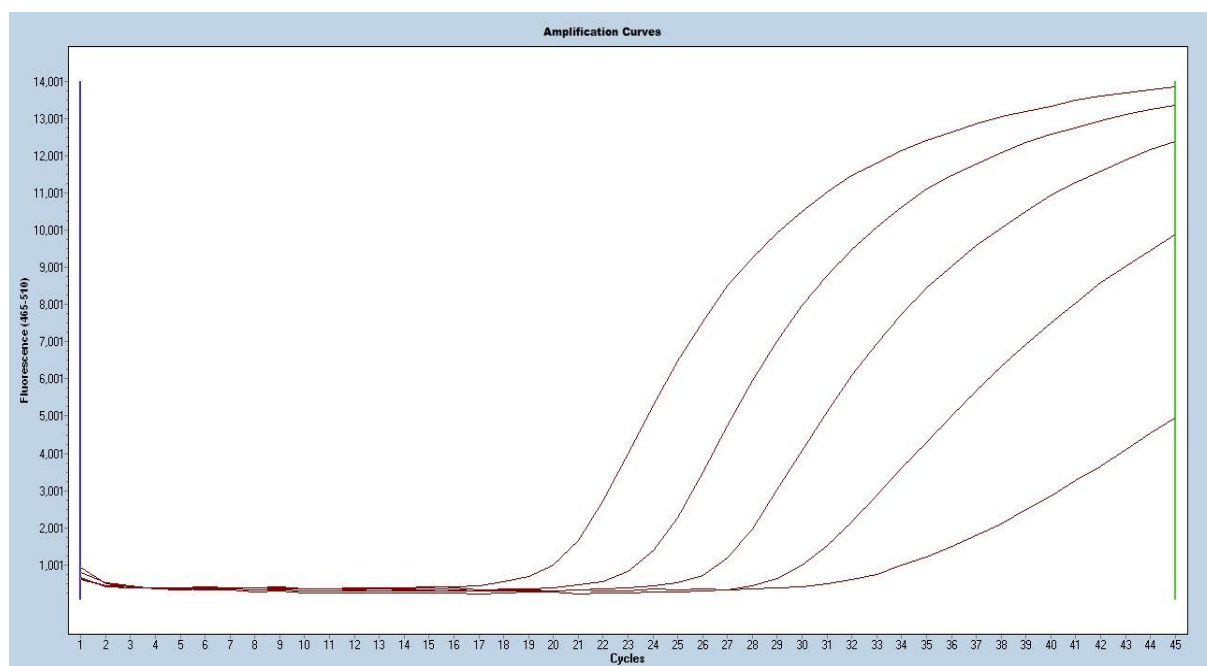


Figure 3 : Série de dilutions pour *Bacteroides* (10^6 - 10^2 copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

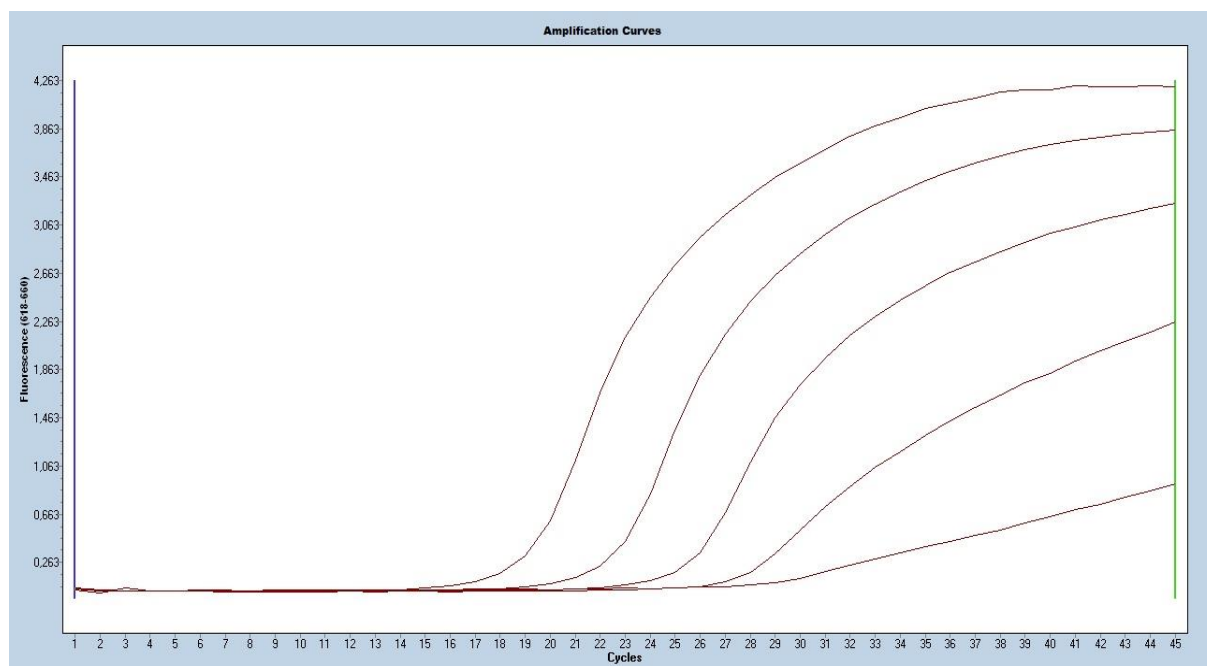


Figure 4 : Série de dilutions pour le cluster XIVa (10^6 à 10^2 copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

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 Gut Balance est spécifique à *Bacteroides* et au cluster XIVa. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 13). Toutes les souches ont été détectées par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Gut Balance et la correspondance de séquence(*).

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

13.3 Réactivité analytique

La réactivité du test en temps réel multiplexe RIDA®GENE Gut Balance a été évaluée par rapport à un exemplaire avec différentes souches de *Bacteroides* et du cluster XIVa (voir tableau 14). Toutes les souches testées ont été détectées par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Gut Balance ou par alignement de séquences (*).

Tableau 14 : Test de la réactivité analytique

<i>Bacteroides</i>					
<i>Bacteroides acidifaciens</i> *	+	<i>Bacteroides fragilis</i>	+	<i>Bacteroides rodentium</i> *	+
<i>Bacteroides caccae</i> *	+	<i>Bacteroides gallinarum</i> *	+	<i>Bacteroides stercorisoris</i> *	+
<i>Bacteroides caecimuris</i> *	+	<i>Bacteroides helcogenes</i> *	+	<i>Bacteroides stercoris</i> *	+
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> *	+	<i>Bacteroides intestinalis</i> *	+	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> *	+
<i>Bacteroides clarus</i> *	+	<i>Bacteroides mediterraneensis</i> *	+	<i>Bacteroides timonensis</i> *	+
<i>Bacteroides dorei</i> *	+	<i>Bacteroides nordii</i> *	+	<i>Bacteroides uniformis</i> *	+
<i>Bacteroides eggerthii</i> *	+	<i>Bacteroides oleiciplenus</i> *	+	<i>Bacteroides xylanisolvens</i> *	+
<i>Bacteroides fingoldii</i> *	+	<i>Bacteroides ovatus</i> *	+		
Cluster XIVa					
<i>Acetivomaculum ruminis</i>	+	<i>Clostridium aminophilum</i>	+	<i>Eubacterium rectale</i>	+
<i>Clostridium aerotolerans</i>	+	<i>Clostridium clostridioforme</i>	+		

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2019-07-15	Version précédente
2023-03-01	5. Instructions de conservation

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Utiliser avant le
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Sans objet

16. Bibliographie

1. Matsuki. Real-time PCR Analysis of human intestinal microflora with 16S rRNA-gene-targeted Genus and species-specific primers. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
2. Mai V *et al.* Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutr. Journal* 2009, 8: 49 – 59.
3. Turnbaugh P *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009, 457(7228): 480 – 484.

4. Vaarala O. Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. Rev. Diab. Stud. 2013, 9(4): 251 -259.