

## RIDA® GENE *Akkermansia muciniphila*

**REF** PG0145



## 1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. RIDA<sup>®</sup>GENE Akkermansia muciniphila est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative et quantitative directe d'ADN d'*Akkermansia muciniphila* dans les échantillons de selles humaines.

## 2. Résumé et explication du test

Il devient de plus en plus manifeste que la composition du microbiote intestinal a des effets sur la santé humaine et est associée à différentes maladies, notamment les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), le syndrome métabolique et l'obésité<sup>3,5</sup>. Il reste aujourd'hui à découvrir si le microbiote est une cause ou un effet de ces maladies.

*Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) est une bactérie gram-négative qui dégrade la mucine et est naturellement présente dans le microbiote humain<sup>1</sup>. Elle représente 3 à 5 % de la population bactérienne d'une personne en bonne santé. *A. muciniphila* se loge dans certaines zones particulières de la muqueuse humaine et peut être détectée dans les échantillons de selles de nourrissons âgés de moins d'un mois. Ensuite, la quantité d'*A. muciniphila* augmente avec l'âge. Chez les personnes âgées, la quantité d'*A. muciniphila* diminue considérablement<sup>2</sup>. *A. muciniphila* peut être en partie associée à un diabète, une adiposité ou une MICI<sup>3,4</sup>.

## 3. Principe du test

RIDA<sup>®</sup>GENE Akkermansia muciniphila est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection, qualitative et quantitative directe d'*Akkermansia muciniphila* dans les échantillons de selles humaines.

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

L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Avec les standards, Standard A, Standard B et Standard C inclus dans le kit, il est possible de quantifier les résultats. Le kit de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup>GENE Akkermansia muciniphila contient un ADN de contrôle interne Internal Control DNA (ICD) qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante.

#### 4. Contenu du paquet

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

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1 050 µl	jaune
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rouge
D	Internal Control DNA	2x	1 700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu
10 <sup>2</sup>	Standard A	1x	100 µl	bleu foncé
10 <sup>4</sup>	Standard B	1x	100 µl	bleu foncé
10 <sup>6</sup>	Standard C	1x	100 µl	bleu foncé

#### 5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. 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<sup>®</sup>GENE Akkermansia muciniphila 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 <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC
Instrument de PCR en temps réel :	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 2.0, LightCycler <sup>®</sup> 480II, LightCycler <sup>®</sup> 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 <sup>™</sup>
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](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit II (PG0002) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler<sup>®</sup> 2.0

- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les appareils

LightCycler<sup>®</sup> 480II et LightCycler<sup>®</sup> 480 z

- 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](http://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<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> GENE Akkermansia muciniphila inclut un Internal Control DNA qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ADN de contrôle interne Internal Control DNA peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

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

Si 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 et 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, le **Positive Control**, le **No Template Control**, l'**Internal Control DNA** et les **Standard A**, **Standard B** et **Standard 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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

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

Pour tout autre type de thermocycleur, seul un échantillon de la courbe standard (**Standard 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 et 8).

### 9.3 Configuration de l'instrument de PCR

#### 9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

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

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

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

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

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

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

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

Étalon A :  $5 \times 10^2$  copies/réaction

Étalon B :  $5 \times 10^4$  copies/réaction

Étalon C :  $5 \times 10^6$  copies/réaction

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



numéro de lot. Lorsque l'ABI 7500 (Applied Biosystems) et le thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad) sont utilisés, une courbe standard doit être incluse dans chaque analyse.

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

### 9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

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

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

<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 :  $5 \times 10^2$  copies/réaction

Étalon B :  $5 \times 10^4$  copies/réaction

Étalon C :  $5 \times 10^6$  copies/réaction

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

## 9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 9 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 2.0	<i>Akkermansia muciniphila</i>	530	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) est nécessaire
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Akkermansia muciniphila</i>	465/510	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Akkermansia muciniphila</i>	465/510	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	540/580	
ABI 7500	<i>Akkermansia muciniphila</i>	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Akkermansia muciniphila</i>	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
Bio-Rad CFX96™	<i>Akkermansia muciniphila</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Akkermansia muciniphila</i>	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	ICD	Jaune	

## 10. Contrôle qualité

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

Le Positive Control a une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu$ l. Chaque série de PCR utilise au total  $5 \times 10^3$  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 * <sup>1</sup>	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	0

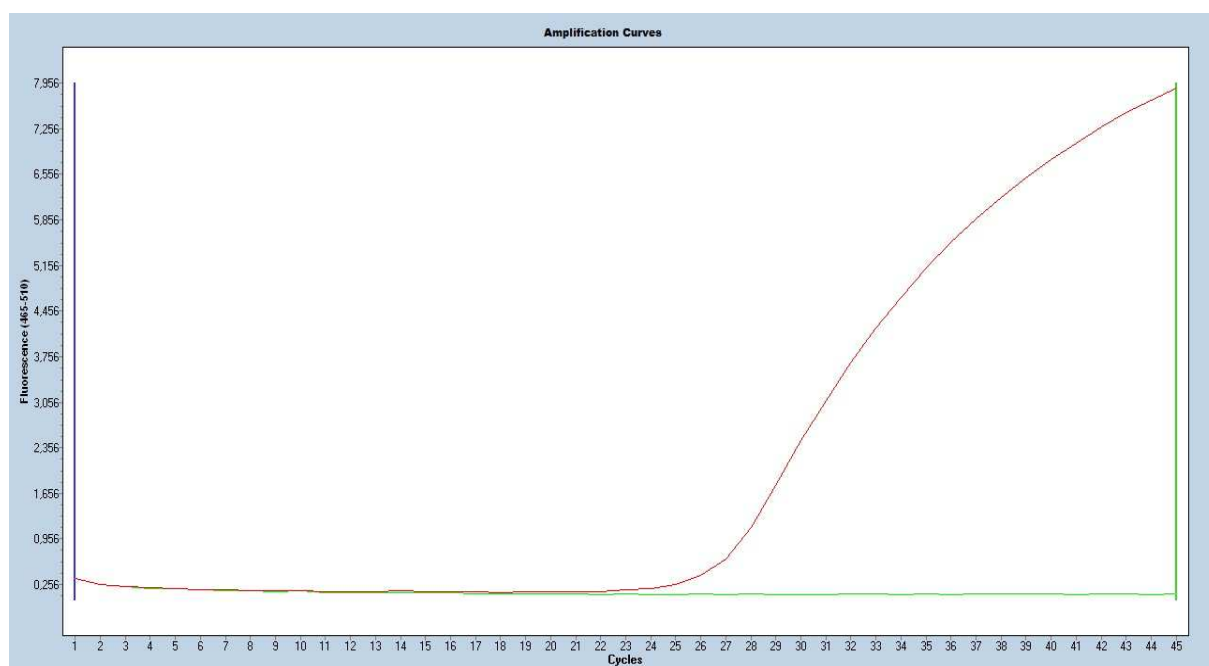
\*<sup>1</sup> Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.

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

**Fig. 1** : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Akkermansia muciniphila*) 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	1,896 – 2,102
Roche LightCycler® 480II	Efficacité	1,896 – 2,102
	Pente	-3,1 – -3,6
Agilent Techn. Mx3005P	Rsq	> 0,98
	Y	-3,1 – -3,6
	Eff.	90 % – 110 %
ABI 7500	Pente	-3,1 – -3,6
	R <sup>2</sup>	> 0,98
	Eff%	90 % – 110 %
Bio-Rad CFX96™	Efficacité	90 % – 110 %
	Courbe std R <sup>2</sup>	> 0,98
Qiagen Rotor-Gene Q	M	3,1 – -3,6
	R <sup>2</sup>	> 0,98

## 11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

**Tableau 11** : Interprétation des échantillons

Gènes cibles		
<i>Akkermansia muciniphila</i>	ICD	Résultat
positif	positif/négatif	<i>Akkermansia muciniphila</i> détectée
négatif*	positif	Gènes cibles non détectés*
négatif	négatif	Non valide

*Akkermansia muciniphila* est détectée si l'ADN de l'échantillon et l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

*Akkermansia muciniphila* est également détectée si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour l'ADN de contrôle interne **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**.

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

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

**\*Remarque : un résultat négatif pour l'ADN d'*Akkermansia muciniphila* est peu probable dans la mesure où ce groupe bactérien appartient à la catégorie des bactéries commensales humaines. En revanche, il est peu probable que les échantillons de selles soient intrinsèquement négatifs pour *Akkermansia muciniphila*. En cas de résultat négatif pour l'ADN d'*Akkermansia muciniphila*, il est probable que l'extraction de l'échantillon n'ait pas abouti lors de l'utilisation de l'ICD comme contrôle de l'inhibition. En cas de résultat négatif pour l'ADN d'*Akkermansia muciniphila*, 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 pour *Akkermansia muciniphila*, 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 pour *Akkermansia muciniphila*, 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 *Akkermansia muciniphila*, 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 *Akkermansia muciniphila* en cellules/g de selles est calculée en utilisant la formule suivante :

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

C [cellules/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 RIDA® Xtract 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 200 µl pour extraction*	x 5
5 µl d'extrait d'ADN utilisé dans la réaction de PCR ((éluat total de 60 µl (= 1/12))	x 12
a. Séquence cible contenue 3 x dans l'ensemble du génome <i>Akkermansia</i>	x 1/6 ( <i>Akkermansia muciniphila</i> )
<b>Facteur de correction (K) pour <i>Akkermansia muciniphila</i>**</b>	<b>0,6 x 10<sup>2</sup></b>

\* Le résultat correspond à 1 g de selles

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

**Tableau 13** : Exemple de calcul du facteur de correction à l'aide de Maxwell® RSC (Promega) pour préparation d'un échantillon dilué selon un rapport 1/3

Description	Facteur
Dilution de l'échantillon à 1/3 avant extraction	x 3
Échantillon de 300 µl pour extraction*	x 3,33
5 µl d'extrait d'ADN dans la réaction de PCR**	x 20
Séquence cible contenue 3x dans l'ensemble du génome <i>Akkermansia muciniphila</i>	x 0,33 ( <i>Akkermansia muciniphila</i> )
<b>Facteur de correction K pour <i>Akkermansia muciniphila</i>***</b>	<b>0,66 x 10<sup>2</sup></b>

\* Le résultat correspond à 1 g de selles

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

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

**Remarque : Pour en savoir plus sur la quantification, veuillez contacter [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).**



## 12. Limites de la méthode

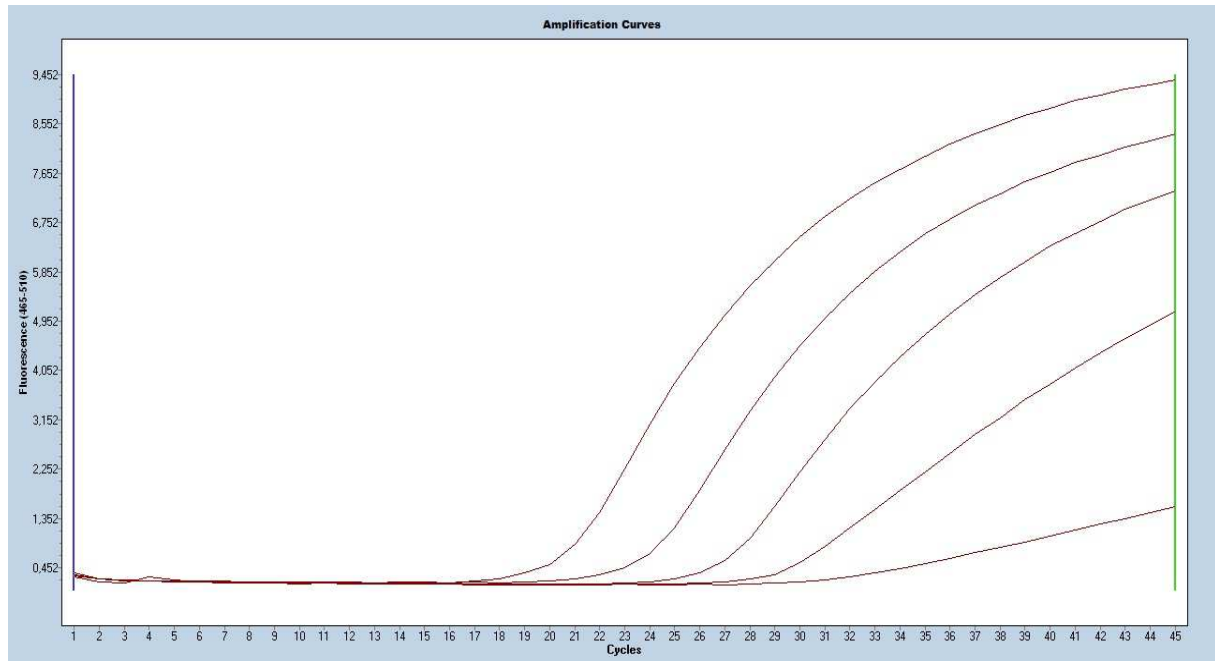
1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de selles humaines.
3. Les prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects 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<sup>®</sup>GENE Akkermansia muciniphila.
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 (16s-rRNA).
8. La mucine peut présenter des caractéristiques d'interférence, même en petites quantités.

## 13. Performances

### 13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE *Akkermansia muciniphila* est  $\geq 10$  copies d'ADN par réaction pour *Akkermansia muciniphila*.

La figure 2 ci-dessous présente une série de dilutions d'*Akkermansia muciniphila* ( $10^6 - 10^2$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II.



**Figure 2** : Série de dilutions pour *Akkermansia muciniphila* ( $10^6 - 10^2$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) 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 Akkermansia muciniphila est spécifique pour *Akkermansia muciniphila*. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 14) :

**Tableau 14** : 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	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	Enterococcus faecium	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Bacteroides fragilis	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
Bifidobacterium bifidum	-	<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>	-	Cryptosporidium muris	-	Lactobacillus ruminis	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	Cryptosporidium parvum	-	Lactobacillus salivaris	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

## 14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2018-11-12	Révision générale 4. Contenu du paquet 5. Instructions de conservation des réactifs 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 11. Interprétation des résultats 12. Limites de la méthode 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

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

### Symboles spécifiques au test

Sans objet

## 16. Bibliographie

1. Derrien M *et al.* Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Sys Evol Microbiology* 2004; 54: 1469-1476.
2. Collado MC *et al.* Intestinal integrity and Akkermansia muciniphila, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults and the elderly. *App Envir Microbiology* 2007; 73: 7767-7770.
3. Dao MC *et al.* Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2015; 0: 1-11.
4. Everard A *et al.* Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *PNAS* 2013; 110: 9066-9071.
5. Cani P *et al.* Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology* 2017; 8:1765.

# RIDA<sup>®</sup> GENE Akkermansia muciniphila

**REF** PG0145

## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA<sup>®</sup> GENE Akkermansia muciniphila è un test di PCR real-time multiplex per la determinazione qualitativa diretta e la quantificazione di DNA di *Akkermansia muciniphila* da campioni fecali umani.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Sta diventando sempre più evidente che la composizione del microbiota intestinale influisce sulla salute umana ed è associata a diverse condizioni patologiche tra cui malattie infiammatorie intestinali (IBD), sindrome metabolica e obesità.<sup>3,5</sup> Attualmente, non è ancora noto se le alterazioni del microbiota siano una causa o una conseguenza di tali malattie.

*Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) è un batterio gram-negativo che degrada le mucine ed è naturalmente presente nel microbiota umano.<sup>1</sup> Rappresenta il 3 - 5 % della popolazione batterica in un individuo sano. *A. muciniphila* si trova in aree particolari della mucosa umana e può essere rilevata nei campioni fecali dei bambini a partire da meno di un mese di vita. In seguito, la quantità di *A. muciniphila* aumenta con l'età. Nelle persone anziane il numero di *A. muciniphila* è significativamente ridotto.<sup>2</sup> *A. muciniphila* può essere parzialmente associato a diabete, adiposità e IBD.<sup>3,4</sup>

## 3. Principio del test

RIDA<sup>®</sup> GENE Akkermansia muciniphila è un test di PCR real-time multiplex per la determinazione qualitativa diretta e la quantificazione di *Akkermansia muciniphila* da campioni fecali umani.

Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione del frammento genetico (se presente) specifico per *Akkermansia muciniphila* (16S-rRNA). I target amplificati vengono rilevati 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 **Standard A**, **Standard B** e **Standard C** inclusi nel kit, è possibile quantificare i risultati. Il kit di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE Akkermansia muciniphila 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
<b>10<sup>2</sup></b>	<b>Standard A</b>	1x	100 µl	blu scuro
<b>10<sup>4</sup></b>	<b>Standard B</b>	1x	100 µl	blu scuro
<b>10<sup>6</sup></b>	<b>Standard C</b>	1x	100 µl	blu scuro

#### 5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. 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 Akkermansia muciniphila 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, LightCycler <sup>®</sup> 480 z
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 si desidera utilizzare piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time diversi, 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 e LightCycler<sup>®</sup> 480 z
- 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 di 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 test RIDA<sup>®</sup>GENE Akkermansia muciniphila 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 stata 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	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 estratto di DNA alla 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:** 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
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 6:** Profilo della PCR real-time del DNA per Mx3005P, ABI7500, CFX96™

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 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<sup>®</sup> GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

**Tabella 7:** Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler<sup>®</sup>

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<sup>™</sup> 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 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 x 10<sup>2</sup> copie/reazione

**Standard B:** 5 x 10<sup>4</sup> copie/reazione

**Standard C:** 5 x 10<sup>6</sup> 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<sup>™</sup> (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 rilevazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rilevazione	Canale di rilevazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 2.0	<i>Akkermansia muciniphila</i>	530	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Akkermansia muciniphila</i>	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Akkermansia muciniphila</i>	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
ABI 7500	<i>Akkermansia muciniphila</i>	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Akkermansia muciniphila</i>	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	ICD	HEX	
Bio-Rad CFX96™	<i>Akkermansia muciniphila</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Akkermansia muciniphila</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	0

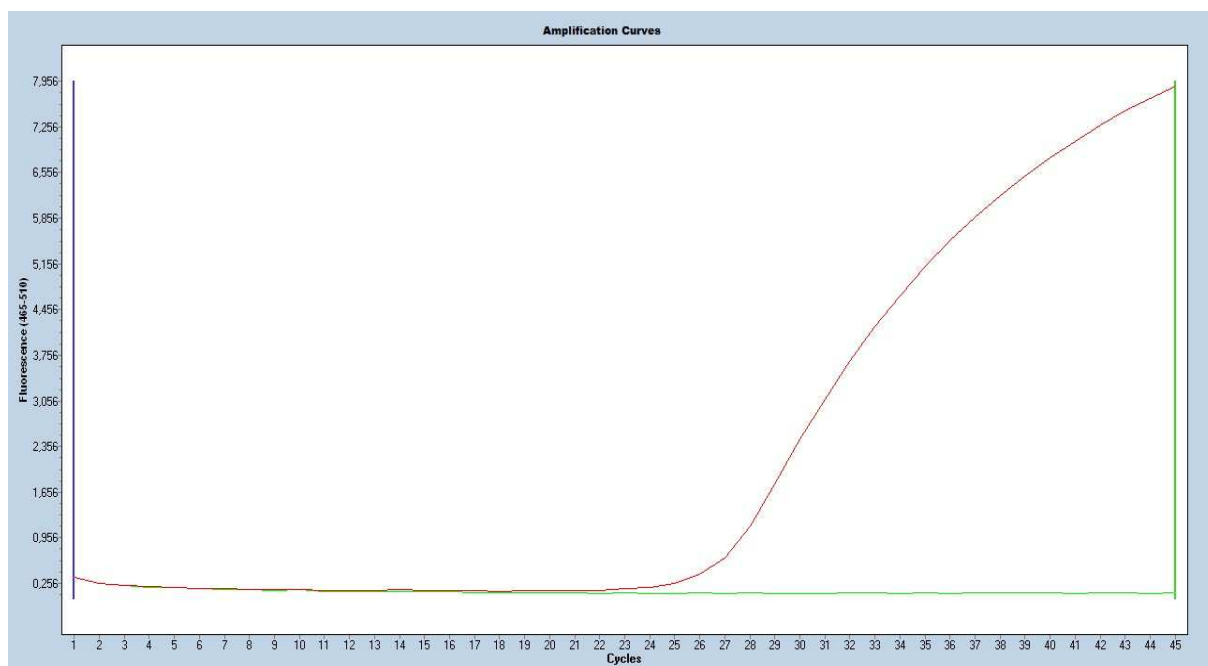
*\*1 Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.*

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test



**Figura 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Akkermansia muciniphila*) 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	1,896 – 2,102
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	Efficienza	1,896 – 2,102
	Pendenza	-3,1 – -3,6
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	Rsq	> 0,98
	Y	-3,1 – -3,6
	Eff.	90 % – 110 %
<b>ABI 7500</b>	Pendenza	-3,1 – -3,6
	R <sup>2</sup>	> 0,98
	Eff%	90 % – 110 %
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	Efficienza	90 % – 110 %
	Curva std R <sup>2</sup>	> 0,98
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	M	3,1 – -3,6
	R <sup>2</sup>	> 0,98



## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

**Tabella 11:** Interpretazione del campione

Geni target		
<i>Akkermansia muciniphila</i>	ICD	Risultato
Positivo	Positivo/Negativo	<i>Akkermansia muciniphila</i> rilevato
negativo*	Positivo	Geni target non rilevati*
Negativo	Negativo	Non valido

*Akkermansia muciniphila* è comprovabile se sia il DNA del campione sia l'**Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

*Akkermansia muciniphila* 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.

*Akkermansia muciniphila* 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 *Akkermansia muciniphila* è improbabile, in quanto questo gruppo batterico appartiene ai batteri commensali umani. Tuttavia, esiste una bassa probabilità che i campioni fecali siano per natura negativi per *Akkermansia muciniphila*. Se si riscontra un risultato negativo per il DNA di *Akkermansia muciniphila* 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 *Akkermansia muciniphila*, 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 ad *Akkermansia muciniphila* la curva standard con **Standard A**, **Standard B** e **Standard C** deve essere eseguita separatamente. 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 ad *Akkermansia muciniphila*, 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 *Akkermansia muciniphila* 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 *Akkermansia muciniphila* in cellule/g di feci è calcolata con la formula seguente:

**C [cellule/g di feci] = c [copie/reazione] x 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 RIDA® Xtract per la preparazione di un campione diluito 1:3.

Descrizione	Fattore
Diluizione del campione 1:3 prima dell'estrazione	x 3
200 µl di campione per l'estrazione*	x 5
5 µl di DNA estratto nella reazione PCR (eluato totale 60 µl (= 1/12))	x 12
a. Sequenza target contenuta 3 volte nel genoma completo di Akkermansia	x 1/6 (Akkermansia muciniphila)
<b>Fattore di correzione (K) per Akkermansia muciniphila**</b>	<b>0,6 x 10<sup>2</sup></b>

\* Il risultato corrisponde a 1 g di feci

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

**Tabella 13:** 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 3 volte nel genoma completo di Akkermansia muciniphila	x 0,33 (Akkermansia muciniphila)
<b>Fattore di correzione K per Akkermansia muciniphila***</b>	<b>0,66 x 10<sup>2</sup></b>

\* 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 [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 12. Limiti del metodo

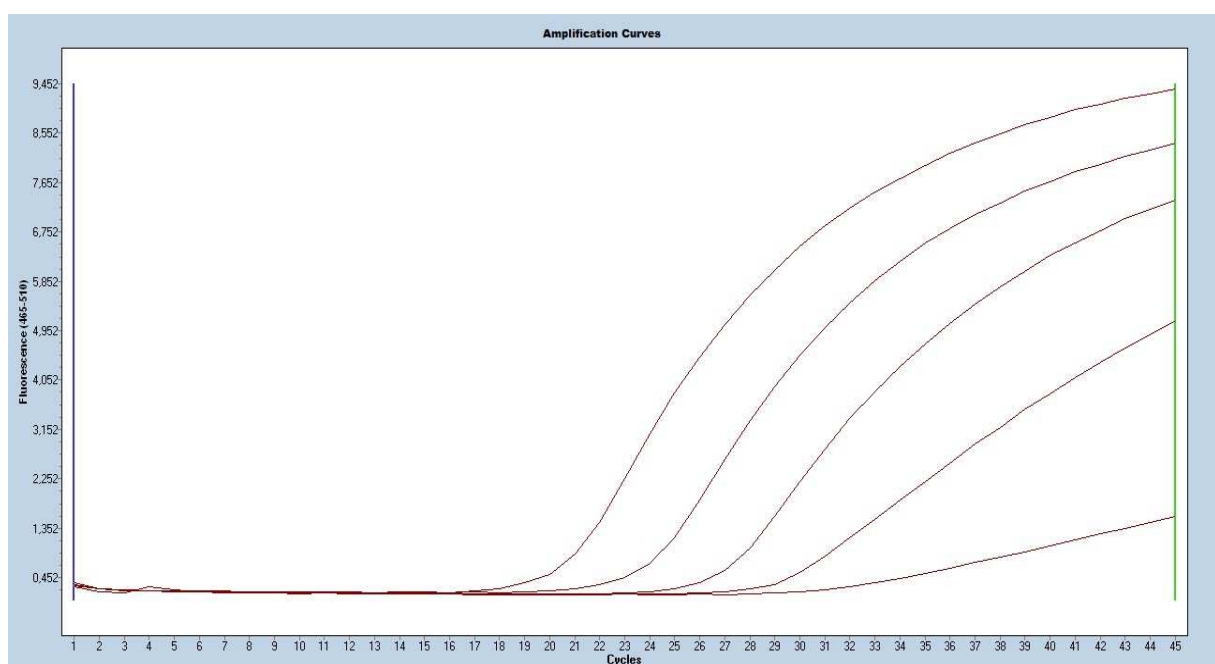
1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di feci umane.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento 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 e causare un risultato falso negativo con il test RIDA<sup>®</sup> GENE *Akkermansia muciniphila*.
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).
8. La mucina può mostrare proprietà di interferenza anche in piccole quantità.

## 13. Prestazioni e caratteristiche

### 13.1 Sensibilità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup> GENE *Akkermansia muciniphila* ha un limite di rivelazione  $\geq 10$  copie di DNA per reazione per *Akkermansia muciniphila*.

La figura 2 seguente mostra una serie di diluizioni di *Akkermansia muciniphila* ( $10^6$  -  $10^2$  copie di DNA per  $\mu$ l) su LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Figura 2:** Serie di diluizioni di *Akkermansia muciniphila* ( $10^6 - 10^2$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) su LightCycler® 480II

Il limite di rivelabilità dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

### 13.2 Specificità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA® GENE *Akkermansia muciniphila* è specifico per *Akkermansia muciniphila*. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 14):

**Tabella 14:** Test di reattività crociata










Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Norovirus GG I	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Norovirus GG II	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifirmentans</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	Enterococcus faecium	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Bacteroides fragilis	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
Bifidobacterium bifidum	-	<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> subsp. <i>fetus</i>	-	Cryptosporidium muris	-	Lactobacillus ruminis	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	Cryptosporidium parvum	-	Lactobacillus salivaris	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2018-11-12	Revisione generale 4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 11. Interpretazione del risultato 12. Limiti del metodo 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. Derrien M *et al.* Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiology* 2004; 54: 1469-1476.
2. Collado MC *et al.* Intestinal integrity and Akkermansia muciniphila, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults and the elderly. *App Envir Microbiology* 2007; 73: 7767-7770.
3. Dao MC *et al.* Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2015; 0: 1-11.
4. Everard A *et al.* Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *PNAS* 2013; 110: 9066-9071.
5. Cani P *et al.* Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology* 2017; 8:1765.