



EurobioPlex

Dermatophytes

PCR EN TEMPS REEL

Pour la PCR **qualitative** en temps réel

REF **EBX-023**



48/96/192 réactions



Version 1.01 du 04.10.2019

Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Biorad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Biorad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) avec analyse sur LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)

Conditions de stockage:

Conserver tous les réactifs entre -15°C et -22°C jusqu'à utilisation et après première utilisation



Mode d'emploi

SOMMAIRE

Utilisation	3
Introduction	3
Principe de la détection	4
Description et contenu du kit	5
Conservation	6
Précautions et notes	7
Collecte des échantillons, transport et conservation	7
Procédure	8
I-Extraction d'ADN	8
II-Réalisation de la PCR en temps réel	8
II-1/ Schéma de la procédure	9
II-2/ Procédure détaillée	10
Validation de l'expérimentation	11
Analyse des données et interprétation	13
Analyse des performances	15
Bibliographie	18
Elimination des déchets	18
Symboles	19

UTILISATION

L'Eurobioplex EBX-023 Dermatophytes est un test d'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel, conçu pour la détection qualitative de la présence ou l'absence de six dermatophytes les plus fréquemment impliqués dans les mycoses cutanées superficielles de la peau et des phanères (dermatophytoses/dermatophyties): *Trichophyton rubrum/violaceum* (détection indifférenciée de ces deux espèces), *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophyte* var. *interdigitale*, *Microsporum canis*, et *Epidermophyton floccosum*, dans un extrait d'acides nucléiques ADN. Le test est indiqué pour poser un diagnostic de présomption d'infection chez l'homme, ou compléter un diagnostic avéré ou indéterminé par les autres techniques telles que l'évaluation directe, et la mise en culture (identification d'après le temps de pousse, les examens macroscopique et microscopique). L'extrait d'ADN est le matériel de départ pour le kit Dermatophytes.

L'Eurobioplex EBX-023 a été validé sur le type de prélèvements suivant:

- Cultures pures de champignons dermatophytes isolés à partir de prélèvements cliniques mycologiques
- Prélèvements cliniques mycologiques (écouvillons frottés sur le cuir chevelu, ongles, squames, peau, cheveux)

INTRODUCTION

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux appartenant aux genres *Microsporum* (M.), *Trichophyton* (T.) et *Epidermophyton* (E.). Ils ont une affinité pour la kératine de la peau et des phanères (cheveux, poils, ongles) produisant des formes cliniques variées : lésions de l'épiderme ou épidermophyties, teignes pour une atteinte du cuir chevelu, folliculites pour l'envahissement du poil par un dermatophyte, onychomycoses pour une atteinte unguéale. Les onychomycoses sont des pathologies fréquemment rencontrées en dermatologie, représentant jusqu'à 50% des onychopathies. Leur prévalence est en constante augmentation depuis quelques années.

De nombreux pathogènes peuvent être la cause de ces dermatophyties. Ils sont caractérisés par la production de spores diverses, et sont répartis en 3 groupes :

1/ anthropophiles, parasites humains exclusifs, se transmettant par contacts, le linge, les sols. *T. rubrum* est le plus fréquent (retrouvé dans 70 à 90% des dermatophytoses), suivi de *T. mentagrophyte interdigitale* et *T. tonsurans* qui appartiennent au complexe *T. mentagrophyte*. *T. violaceum*, qui appartient au complexe *T. rubrum*, et *E. floccosum* sont également des espèces anthropophiles.

2/ anthro-po-zoophiles, qui se transmettent à l'homme par le biais d'un animal contaminé (griffes, poils ; ex : *M. canis*, *M. equinum*, *M. gallinae*, *M. persicolor*, *T. equinum*, *T. mentagrophyte* var. *mentagrophyte*, *T. sarkisovii*, *T. simmii* et *T. verrucosum*). *M. canis*, transmis par le chat, est le plus fréquent de ce groupe et deuxième agent pathogène rencontré.

3/ géophiles ou telluriques, se trouvant sur le sol (ex : *T. terrestre*, *M. gypseum*).

La fréquence de chaque espèce varie en fonction des pays. En Europe du Nord et en Amérique du Nord, les principaux pathogènes sont *T. rubrum* et *M. canis*. Les dermatophytes zoophiles sont plus fréquents en Europe du Sud et dans les pays

arabes. Les principales espèces rencontrées en France métropolitaine sont *T. rubrum*, *T. mentagrophyte* var. *interdigitale*.

Il n'existe pas de diagnostic précis d'identification du dermatophyte responsable de la lésion kératinienne par le clinicien. Les erreurs diagnostiques demeurent fréquentes de par la ressemblance morphologique marquée de certains de ces dermatophytes. En cas de suspicion de mycose, le prélèvement mycologique avec examen direct et culture est systématique et obligatoire, et ce idéalement avant tout traitement. Le traitement doit être local dans tous les cas, et général et prolongé dans les cas d'atteinte des phanères. Il est généralement proposé sans attendre le résultat des examens macro- (couleur et texture) et microscopique (aspect des filaments et des spores) post culture qui durent 3 à 5 semaines. Les dermatophytes se reproduisent sur le milieu de Sabouraud en formant des filaments (mycéliens) et des spores issues d'une reproduction asexuée appelées conidies. Selon leur genre, ces champignons peuvent produire des microconidies (*Microsporum* spp, *Trichophyton* spp) ou non (*E. floccosum*). Dès lors, un diagnostic précis permet d'éviter des surcoûts et du temps perdu, car le traitement peut s'avérer inefficace pour un diagnostic erroné. La connaissance de l'espèce permet de préciser l'origine de la contamination.

Le test d'amplification génique par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est la technique la plus spécifique et la plus rapide pour le diagnostic ciblé des dermatophytes. Bien qu'ils présentent une forte homologie de séquence, le multiplex EBX-023 permet d'amplifier spécifiquement l'ADN des dermatophytes suivants : *T. rubrum/violaceum* (détection indifférenciée), *T. tonsurans*, *M. canis*, *T. mentagrophyte interdigitale*, et *E. floccosum*.

PRINCIPE DE LA DETECTION

L'Eurobioplex EBX-023 est un test d'amplification de l'acide désoxyribonucléique (ADN) fongique de *T. rubrum/violaceum* (détection indifférenciée de ces deux espèces), *T. tonsurans*, *M. canis*, *T. mentagrophyte interdigitale*, et *E. floccosum*, ainsi que d'un contrôle d'extraction d'ADN et d'inhibition de PCR, qui utilise l'amplification par PCR en temps réel. Le test est réalisé à partir de l'ADN extrait de l'échantillon au moyen d'une double réaction dans deux puits/tubes.

Le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR permet de déterminer de possibles variations pouvant se produire au cours des étapes d'extraction d'ADN d'échantillons biologiques et d'amplification par PCR en temps réel. Il permet ainsi de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à une mauvaise extraction d'ADN, et/ou à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité.

Il s'agit d'un kit composé de deux oligomixs différents permettant chacun de détecter les différents pathogènes indiqués ci-dessous :

Oligomix 1 : *M. canis* (MC) et *T. mentagrophyte interdigitale* (TI) + contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR),

Oligomix 2 : *T. rubrum/violaceum* (TR+TV ; détection indifférenciée), *T. tonsurans* (TT), et *E. floccosum* (EF) + contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR).

L'ADN de MC et TI est respectivement détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM et HEX. L'ADN de (TR+TV) est détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM, et celui de

TT et EF est respectivement détecté à l'aide d'une sonde marquée HEX et Texas Red. Pour les deux multiplexs, le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR est détecté à l'aide d'une sonde marquée CY5. Tous émettent une fluorescence spécifique suite à l'hydrolyse de leur sonde respective au cours de l'élongation du produit d'amplification. La mesure des intensités de fluorescence en temps réel est relative à l'accumulation des produits d'amplification spécifiques.

DESCRIPTION ET CONTENU DU KIT

Le kit de PCR en temps réel Dermatophytes est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de *T. rubrum/violaceum* (détection indifférenciée), *T. tonsurans*, *M. canis*, *T. interdigitale*, et *E. floccosum*.

La fluorescence est émise et mesurée de façon individuelle par un système optique au cours de la PCR. La détection des fragments amplifiés est réalisée par un fluorimètre en utilisant les canaux indiqués dans le Tableau 1 ci-dessous.

Le kit contient les réactifs et l'enzyme nécessaires à l'amplification de l'ADN de ces champignons, et du contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (Tableau 2).

3 formats sont disponibles pour ce kit :

- **48 réactions pour tester jusqu'à 22 échantillons de patients** avec les deux oligomixs proposés,
- **96 réactions pour tester jusqu'à 46 échantillons de patients** avec les deux oligomixs proposés,
- **192 réactions pour tester jusqu'à 94 échantillons de patients** avec les deux oligomixs proposés.

Tableau 1 : Pathogènes détectés par chaque oligomix

Cible	Oligomix 1	Oligomix 2	Fluorophore
<i>Microsporum canis</i>	X	-	FAM
<i>Trichophyton interdigitale</i>	X	-	HEX
<i>Trichophyton rubrum</i> + <i>Trichophyton violaceum</i>	-	X	FAM
<i>Trichophyton tonsurans</i>	-	X	HEX
<i>Epidermophyton floccosum</i>	-	X	Texas Red
Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)	X	X	Cy5

Longueurs d'ondes d'excitation/émission pour FAM (495/515 nm), HEX (535/555 nm), Texas Red (585/605 nm), CY5 (647/667 nm).

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR:

- Canal **FAM** (Systèmes ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx), Canal 510 (LC 480), Canal Green (RotorGene)
- Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 580 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene)
- Canal **Texas Red**: LC Red 610 (LC480), Canal Orange (RotorGene)
- Canal **Cy5** (Systèmes ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Note : Sur LC480 instrument II : Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes FAM-HEX/VIC-TexasRed-Cy5 (465-510, 533-580, 533-610, 618-660).

Tableau 2 :

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	192 réactions	96 réactions	48 réactions	Reconstitution
Rouge	Enzyme	8 x 375 µl	4 x 375 µl	2 x 375 µl	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix 1	4 x 210 µl	2 x 210 µl	210 µl	Prêt à l'emploi
Vert	Oligomix 2	4 x 210 µl	2 x 210 µl	210 µl	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H ₂ O)	1 ml	1 ml	1 ml	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle Positif Dermatophytes 1 (CP1)	4 x 40 µl	2 x 40 µl	40 µl	Prêt à l'emploi
Orange	Contrôle Positif Dermatophytes 2 (CP2)	4 x 40 µl	2 x 40 µl	40 µl	Prêt à l'emploi
Blanc	Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)	4 x 300 µl	2 x 300 µl	300 µl	Prêt à l'emploi

Oligomix1 : contient les amorces et sondes du triplex MC + TI + CI-PCR

Oligomix2 : contient les amorces et sondes du quadriplex (TR+TV) + TT + EF + CI-PCR

Matériel nécessaire non fourni:

- ◇ Hotte biologique
- ◇ Appareil de PCR en temps réel
- ◇ Centrifugeuse pour microtubes
- ◇ Vortex
- ◇ Plaques / tubes pour réaction de PCR en temps réel
- ◇ Micropipettes
- ◇ Embouts DNase-free et RNase-free à filtre pour micropipettes
- ◇ Microtubes stériles
- ◇ Gants (sans talc)

CONSERVATION

Tous les réactifs doivent être stockés entre -15°C et -22°C.

Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.

Plusieurs cycles de congélation / décongélation (>3x) doivent être évités, cela pourrait réduire la sensibilité de l'analyse.

PRECAUTIONS ET NOTES

Lire attentivement ces instructions avant de débiter la procédure.

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par du personnel compétent.
- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant.
- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée.
- ◇ Le kit est expédié sous carboglace, et les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plus des composants arrive décongelé, ou si les tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter Eurobio Scientific.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ L'utilisation de glace ou d'un bloc réfrigérant est conseillée en cas de longs délais du fait par exemple d'un nombre important d'échantillons à traiter ou de fortes températures.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ADN, 2) Préparation du mélange réactionnel et 3) Amplification / Détection des produits amplifiés.
- ◇ Porter des blouses et des gants (sans talc) distincts dans chaque zone de travail.
- ◇ Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces zones.
- ◇ Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels.
- ◇ Des méthodes appropriées de préparation/extraction d'ADN pour une production d'ADN de qualité et une application de PCR en temps réel doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les DNases.
- ◇ Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, DNase-free et RNase-free.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.

COLLECTE DES ECHANTILLONS, TRANSPORT ET CONSERVATION

- ◇ Collecter les échantillons dans des contenants stériles (exemple : boîte de pétri).
- ◇ Il revient à l'utilisateur de maîtriser ses propres conditions de collecte, transport, conservation et extraction des échantillons pour que l'extraction d'ADN par des systèmes adaptés produise des ADN de qualité.
- ◇ Il est recommandé que les échantillons soient conservés selon les recommandations de stockage des échantillons avant extraction (Tableau 3).

Tableau 3 :

Recommandations de stockage maximum des échantillons avant extraction	
Température ambiante	1 mois

- ◇ L'utilisateur peut se référer aux recommandations émises par l'Organisation Mondiale de la Santé ou par la Haute Autorité de Santé pour la bonne conservation des échantillons.
- ◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.

PROCEDURE

I- Extraction d'ADN

Il revient aux utilisateurs de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est adapté aux types de prélèvements concernés et est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Pour le présent coffret, vous pouvez utiliser votre propre système d'extraction ou un système commercial adapté en se référant aux instructions du fabricant, qui utilise en général pour les prélèvements de peau ou d'ongle, un pré-traitement. Celui-ci consiste en une incubation sous agitation du prélèvement en présence de tampon de lyse, de protéinase K, et/ou de billes de silice, éventuellement suivi d'une homogénéisation. L'ADN doit être ensuite extrait.

Le kit étant destiné à une utilisation sur de l'ADN extrait, il revient à l'utilisateur de valider la méthode d'extraction qu'il a choisi.

Dans le kit Dermatophytes, le CI-PCR sur le canal CY5 peut être ajouté avant l'extraction ou dans la réaction de PCR. Il permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à un problème d'extraction ou la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité pour valider le test.

Nous recommandons l'ajout de 10 µl de CI-PCR par extraction et un volume d'élution de 50 µl à la fin de l'extraction. Si le CI-PCR n'est rajouté que pour contrôler la PCR, il est ajouté au mélange réactionnel (1 µl par réaction de PCR). Voir Protocole de PCR en temps réel pour plus de détails.

Le CI-PCR est également disponible chez Eurobio Scientific (Ref EurobioPlex EBX-002).

II- Réalisation de la PCR en temps réel

Remarque générale:

Les contrôles positifs Dermatophytes CP1 et CP2, ainsi que le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR), contiennent des concentrations élevées de matrice. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination. Pour contrôler le bon fonctionnement de la PCR, il est nécessaire de tester les contrôles positifs CP1 et CP2 selon le multiplex utilisé, ainsi que les contrôles négatifs (eau fournie= CN-H₂O + CI-PCR) (voir II-2/ 6) du protocole de PCR en temps réel).

II-1/ Schéma de la procédure

1 - PREPARATION MELANGES REACTIONNELS / MASTERMIXS

(a) Pour un échantillon ADN extrait sans CI-PCR

Nombre de réaction(s)	N+3
Enzyme	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix 1 ou 2	(N+3) x 7.5 µl
CI-PCR	(N+3) x 1 µl
Volume total Mastermix 1 ou 2	(N+3) x 21 µl

(b) Pour un échantillon ADN extrait avec CI-PCR

Nombre de réaction(s)	N+3
Enzyme	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix 1 ou 2	(N+3) x 7.5 µl
Volume total Mastermix 1 ou 2	(N+3) x 20 µl



2 - PREPARATION DES REACTIONS

Echantillon

20 µl de Mastermix 1 ou 2
+
5µl échantillon ADN

Contrôles positifs

20 µl de Mastermix 1 + 5µl CP1 20 µl de Mastermix 2 + 5µl de CP2

Contrôles Négatifs

20 µl de Mastermix 1 ou 2
+
5µl Eau biologie moléculaire (CN-H2O)

Echantillon

20 µl de Mastermix 1 ou 2
+
5µl échantillon ADN

Contrôles positifs

20 µl de Mastermix 1 + 5µl CP1 20 µl de Mastermix 2 + 5µl de CP2

Contrôles Négatifs

20 µl de Mastermix 1 ou 2
+
4µl Eau biologie moléculaire (CN-H2O)
+
1 µl CI-PCR



3 – INSTRUMENT PCR EN TEMPS REEL

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Dénaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	40	-
	56°C	30 sec		-
	72°C	45 sec		Acquisition de fluorescence

II-2/ Procédure détaillée

- 1) Homogénéiser le tube d'Enzyme, et vortexer Oligomix 1 et 2, CP1 et CP2, et CI-PCR, puis centrifuger.
- 2) Préparer les Mastermixs 1 et 2 comme ci-dessous, N étant le nombre de réactions, prévoir la quantité de Mastermix pour N+3 réactions minimum (Se référer à la partie 1-(a) ou 1-(b) du schéma précédent selon le cas).

Cas (a) : Pour un échantillon ADN extrait SANS CI-PCR

Nombre de réaction(s)	1	N+3
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix 1 ou 2	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl
CI-PCR	1 µl	(N+3) x 1 µl
Volume total Mastermix 1 ou 2	21 µl*	(N+3) x 21 µl

Cas (b) : Pour un échantillon ADN extrait AVEC CI-PCR

Nombre de réaction(s)	1	N+3
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix 1 ou 2	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl
Volume total Mastermix 1 ou 2	20 µl*	(N+3) x 20 µl

* : La différence de volume réactionnel entre les cas (a) et (b) est négligeable et n'a pas d'effet sur les performances.

- 3) Homogénéiser les Mastermixs préparés en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 µL de Mastermix* 1 ou 2 à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre dans chaque tube/puits de microplaque pour PCR en temps réel.
- 5) Ajouter 5 µL d'échantillon d'ADN extrait.
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :

- Contrôles positifs :

20 µl de Mastermix 1 + 5 µl de contrôle positif CP1

20 µl de Mastermix 2 + 5 µl de contrôle positif CP2

- Contrôles négatifs :

Cas (a) : Pour un échantillon ADN extrait SANS CI-PCR :

- 20µL de Mastermix 1 + 5µL d'eau fournie (CN-H2O)

- 20µL de Mastermix 2 + 5µL d'eau fournie (CN-H2O)

Cas (b) : Pour un échantillon ADN extrait AVEC CI-PCR

- 20µL de Mastermix 1 + 1µL de CI-PCR + 4µL d'eau fournie (CN-H2O)

- 20µL de Mastermix 2 + 1µL de CI-PCR + 4µL d'eau fournie (CN-H2O)

- 7) Fermer immédiatement avec un film adhésif ou bouchons transparents pour éviter toute contamination.
- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.

9) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR en temps réel.

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Dénaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	40	-
	56°C	30 sec		-
	72°C	45 sec		Acquisition de fluorescence

Note 1 : Sur LightCycler® 480 (Roche), deux systèmes optiques existent : seul le « System II » est compatible avec l'utilisation du kit. Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes FAM-HEX/VIC-TexasRed-Cy5 (465-510, 533-580, 533-610, 618-660).

Note 2 : Pour les appareils de la gamme Applied Biosystems, sélectionner « NONE » dans « PASSIVE REFERENCE ».

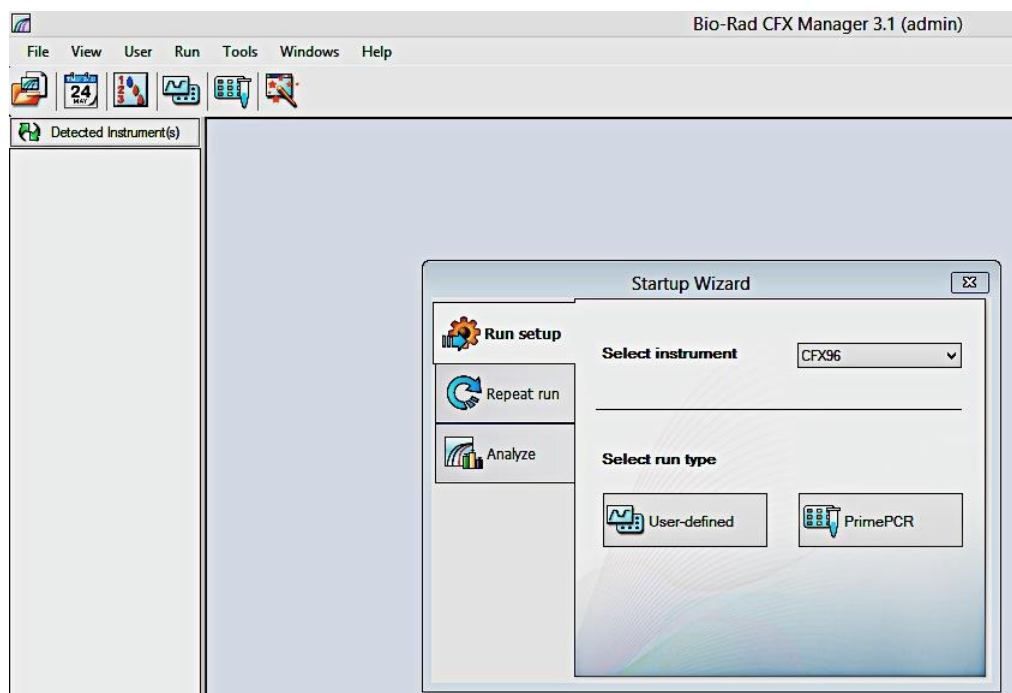
Note 3 : Sur Rotorgene™, calibrer le signal en cliquant sur « GAIN OPTIMISATION ».

Note 4 : Sur CFX96 (Biorad), lancer le run à partir de la version 1.6 ou postérieure, puis analyser avec la version 3.1 (voir § Validation de l'expérimentation).

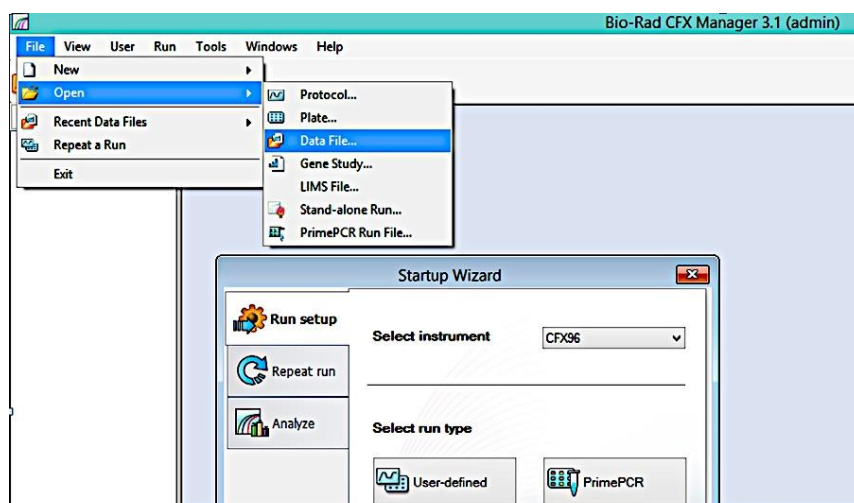
VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

L'analyse des data post-acquisition sur un appareil de PCR CFX96 (Biorad) doit être réalisée à l'aide de la version 3.1 du logiciel CFX Manager (Biorad). Afin de passer sur cette version à partir d'un run lancé sur une version antérieure, veuillez suivre la procédure suivante: à la fin du run, le fichier de données avec le suffixe .pcrd doit être ouvert et traité avec la version 3.1 du CFX Manager (Biorad).

Si le run a été lancé avec le logiciel CFX Manager v1.6 par exemple, pour ouvrir un fichier de data avec le logiciel CFX Manager v3.1, cliquer sur l'icône CFX Manager v3.1. L'écran d'accueil apparaît.

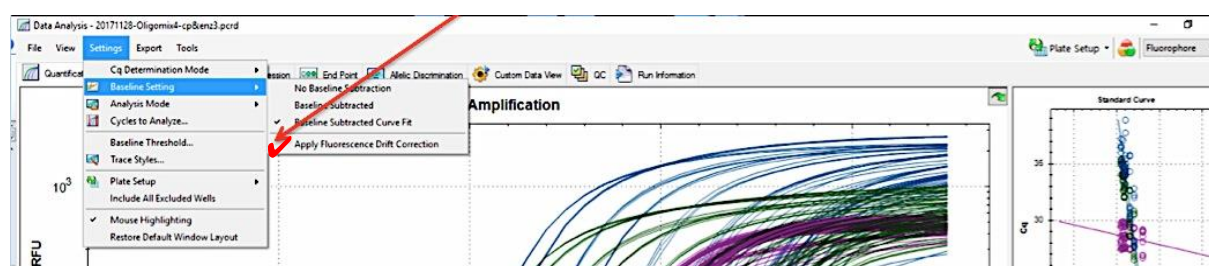


- Cliquer sur File et sélectionner Open puis Data File.



- Sélectionner le fichier que vous souhaitez analyser et cliquer sur Ouvrir.

L'option « drift correction » doit être appliquée dans l'onglet « Settings » comme sur l'image ci-dessous : cliquer sur l'onglet Settings, puis sur Baseline Setting et sur Apply Fluorescence Drift Correction.



Une fois cette étape réalisée, l'analyse peut débuter.

Pour que le dosage soit valide, les résultats pour les contrôles doivent être les suivants (Tableau 4) ; autrement l'expérimentation ne peut être validée.

Tableau 4 :

Contrôles Positifs		
Canal	CP1	CP2
FAM	POSITIF (Ct ≤ 40)	POSITIF (Ct ≤ 40)
HEX	POSITIF (Ct ≤ 40)	POSITIF (Ct ≤ 40)
TEXAS RED	Non applicable	POSITIF (Ct ≤ 40)
Contrôles Négatifs		
Canal	Contrôle Négatif Mastermix 1	Contrôle Négatif Mastermix 2
FAM	Non déterminé	Non déterminé
HEX	Non déterminé	Non déterminé
TEXAS RED	Non applicable	Ct ≥ 37 ou non déterminé
CY5	POSITIF (Ct ≤ 40)	POSITIF (Ct ≤ 40)

CP1: Contrôle positif Dermatophytes pour le Multiplex 1

CP2: Contrôle positif Dermatophytes pour le Multiplex 2

ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

Contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR dans les échantillons:

Deux résultats peuvent être obtenus :

1/ le test du contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR ; canal Cy5) est positif : l'ADN a été correctement extrait, et il n'y a pas d'inhibiteurs de PCR. Le résultat peut être validé.

2/ le test du contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR ; canal Cy5) est négatif : soit l'ADN n'a pas été extrait, soit la PCR n'a pas bien fonctionné, soit la présence d'inhibiteurs de PCR inhibe la réaction de PCR. Il est alors recommandé de répéter l'extraction ou de diluer l'échantillon sauf si un signal spécifique est détecté dans les canaux cibles (FAM, HEX, Texas Red).

OLIGOMIX 1 :

Pour les échantillons cliniques testés avec l'Oligomix 1, les résultats suivants sont possibles :

***Seuil de Ct pour positivité des échantillons :**

Canal FAM *Microsporium canis* : + Positif => Ct positif (≤ 40)

Canal HEX *Trichophyton interdigitale* : + Positif => Ct positif (≤ 40)

Signal PCR			Présence de MC	Présence de TI	Validité du test/commentaire
FAM	HEX	CY5			
+	+	+	Oui	Oui	Valide
+	-	+	Oui	Non	Valide
-	+	+	Non	Oui	Valide
-	-	+	Non	Non	Valide
+	+	-	Oui	Oui	Valide : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui n'empêche pas la détection de MC et TI.
+	-	-	Oui	Non interprétable	Valide pour MC : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui n'empêche pas la détection de MC. Non valide pour TI : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui empêcherait la détection de TI -diluer 5 x l'échantillon. Si même résultat extraire à nouveau l'échantillon.
-	+	-	Non interprétable	Oui	Valide pour TI : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui n'empêche pas la détection de TI. Non valide pour MC : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui empêcherait la détection de MC -diluer 5 x l'échantillon. Si même résultat extraire à nouveau l'échantillon.
-	-	-	Non interprétable	Non interprétable	Non valide : Problème d'extraction ou Inhibition de PCR -diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat extraire à nouveau l'échantillon.

MC : *Microsporium canis* ; TI : *Trichophyton interdigitale*

OLIGOMIX 2 :

Pour les échantillons cliniques testés avec l'Oligomix 2, les résultats suivants sont possibles :

***Seuil de Ct pour positivité des échantillons :**

Canal FAM *Trichophyton rubrum* + *Trichophyton violaceum* : + Positif => Ct positif (≤ 40)

Canal HEX *Trichophyton tonsurans* : + Positif => Ct positif (≤ 40)

Canal TEXAS RED *Epidermophyton floccosum* : + Positif => Ct positif et < 37

Signal PCR				Présence de TR ou TV	Présence de TT	Présence de EF	Validité du test/commentaire
FAM	HEX	Texas Red	CY5				
+	+	+	+	Oui	Oui	Oui	VALIDE
+	+	-	+	Oui	Oui	Non	
+	-	+	+	Oui	Non	Oui	
-	+	+	+	Non	Oui	Oui	
+	-	-	+	Oui	Non	Non	
-	+	-	+	Non	Oui	Non	
-	-	+	+	Non	Non	Oui	
-	-	-	+	Non	Non	Non	
+	+	+	-	Oui	Oui	Oui	Valide : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui n'empêche pas la détection de TR ou TV, TT et EF.
+	-	-	-	Oui	Non interprétable	Non interprétable	Possible inhibition de PCR qui n'empêche pas la détection d'un ou plusieurs pathogènes (indiquée par « Oui »); valide pour ce(s) pathogène(s) MAIS possible inhibition de PCR qui empêcherait la détection de(s) autre(s) pathogène(s) ciblé(s) → diluer 5 x l'échantillon. Si même résultat extraire à nouveau l'échantillon.
-	+	-	-	Non interprétable	Oui	Non interprétable	
-	-	+	-	Non interprétable	Non interprétable	Oui	
+	+	-	-	Oui	Oui	Non interprétable	
+	-	+	-	Oui	Non interprétable	Oui	
-	+	+	-	Non interprétable	Oui	Oui	
-	-	-	-	Non interprétable	Non interprétable	Non interprétable	Non valide : Problème d'extraction ou d'inhibition de PCR Diluer 5x l'échantillon ; si même résultat le re-extraire.

TR+TV : *Trichophyton rubrum* + *Trichophyton violaceum* (détection croisée des deux espèces)

TT : *Trichophyton tonsurans*

EF : *Epidermophyton floccosum*

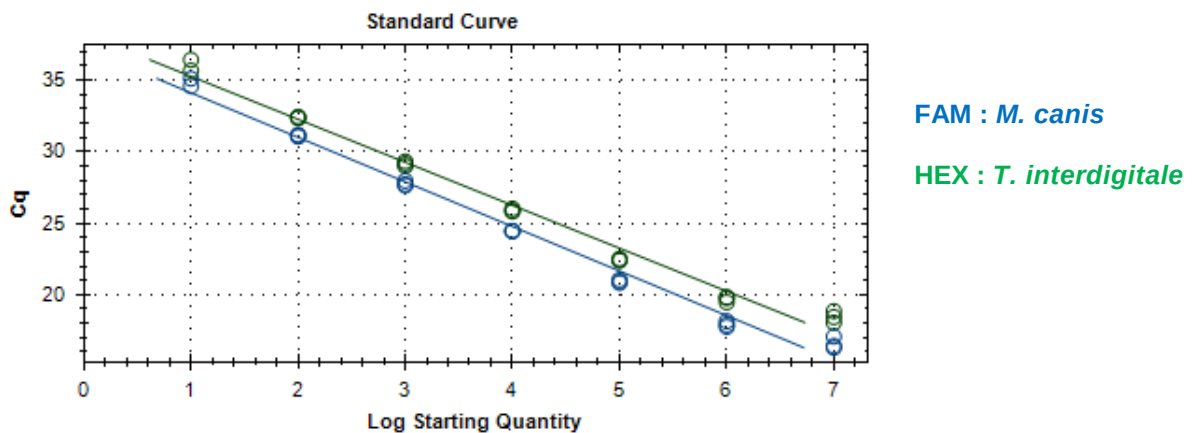
Notons que du fait de la forte homologie de séquence observée entre dermatophytes, des résultats positifs n'excluent pas la possibilité de co-infection par d'autres espèces dermatophytes qui ne sont pas spécifiquement ciblées par ce kit. Par exemple, il est possible que :

- certaines souches du complexe *Arthroderma otae* dont *M. ferrugineum* et *M. equinum*, soient reconnues par le système de détection de *M. canis*,
- *T. soudanense*, *T. gourvilii*, *T. circinvolutum* soient reconnues par le design de *T. rubrum* ; celui-ci présente une détection croisée démontrée avec *T. violaceum*,
- *T. equinum* soit reconnu par le design de *T. tonsurans*
- *Arthroderma benhamiae*, *Arthroderma vanbreuseghemii* soient reconnus par le design de *T. mentagrophyte interdigitale*

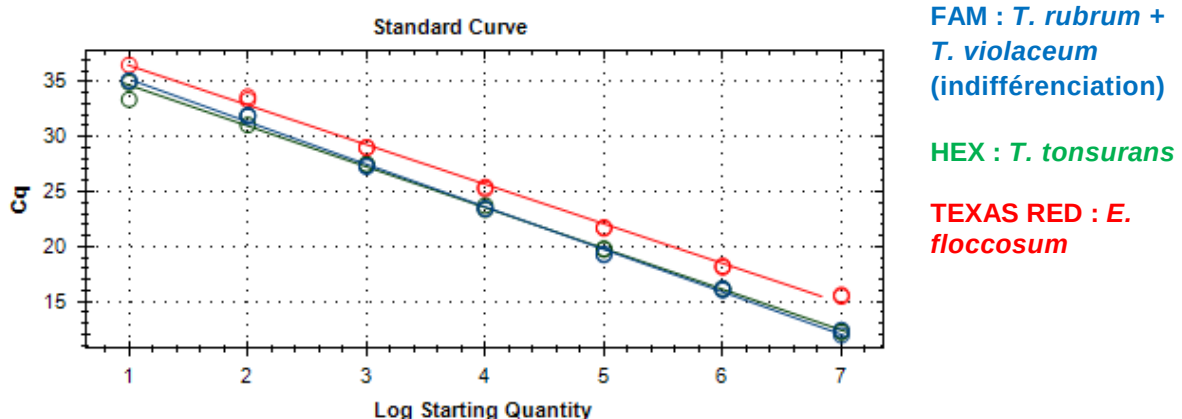
ANALYSE DES PERFORMANCES

Exemple d'expérience réalisée sur thermocycleur PCR temps réel CFX96 (Biorad) :

Avec l'Oligomix 1 :



Avec l'Oligomix 2 :



Variabilité du signal

	Dermatophytes cibles	INTRA-EXPERIENCE CV moyen (%)	INTER-EXPERIENCES CV moyen (%)
Oligomix 1	MC	0.70	5.59
	TI	0.81	6.64
Oligomix 2	TR+TV	0.77	1.67
	TT	0.88	2.36
	EF	0.75	1.87

CV : Coefficient de Variation

Validation sur les échantillons cliniques :

La spécificité et la sensibilité ont été analysées à partir de 66 échantillons d'ADN extrait de prélèvements mycologiques (écouvillons frottés sur le cuir chevelu, ongles, squames, peau, cheveux), ou extrait de cultures pures de champignons dermatophytes isolés à partir de prélèvements cliniques, et identifiés par analyse de la morphologie macro- et microscopique, spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquençage de la région ITS2 de l'ARNr.

Les espèces couvertes par cette analyse sont les suivantes :

- *M.canis* (MC), n= 11
- *T. interdigitale* (TI), n= 12
- *T. rubrum* (TR) + *T.violaceum* (TV), n=29
- *T. tonsurans* (TT), n= 9
- *E. floccosum* (EF), n= 5

Plusieurs tests sur des échantillons d'ADN non dilués ou dilués ont été réalisés ; le bilan figure ci-dessous. Les tests ont été réalisés sur CFX96.

Détection pour MC et TI:

		EBX-023 DERMATOPHYTES					
		MC			TI		
		POSITIFS	NEGATIFS	TOTAL	POSITIFS	NEGATIFS	TOTAL
Pretest	POSITIFS	11	0	11	10	2	12
	NEGATIFS	0	35	35	0	34	34
	TOTAL	11	35	46	10	36	46

Détection pour TR+TV, TT et EF :

		EBX-023 DERMATOPHYTES								
		TR+TV			TT			EF		
		POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL
Pretest	POS	29	0	29	9	0	9	5	0	5
	NEG	0	28	28	0	48	48	0	52	52
	TOTAL	29	28	57	9	48	57	5	52	57

Spécificité, Sensibilité et Concordance :

Cibles	Spécificité	Sensibilité	Concordance
<i>Microsporum canis</i>	> 99 %	> 99 %	> 99 % (n=46)
<i>Trichophyton interdigitale</i>	> 99 %	83.3 %	95.7 % (n=44/46)
<i>Trichophyton rubrum/violaceum</i> *	> 99 %	> 99 %	> 99 % (n=57)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	> 99 %	> 99 %	> 99 % (n=57)
<i>Epidermophyton floccosum</i>	> 99 %	> 99 %	> 99 % (n=57)

* détection croisée entre TR et TV

Aucune cross réactivité n'a été observée avec le système de détection de :

- MC sur les échantillons TI, TT, EF, TR ou TV
- TI sur les échantillons MC, TT, EF, TR ou TV
- TV+TR sur les échantillons TT, EF, MC ou TI
- TT sur les échantillons MC, TI, EF, TR ou TV
- EF sur les échantillons MC, TI, TT ou TV

Une amplification tardive non spécifique pour un échantillon TR non dilué, sur les 28 testés, a été observée avec un Ct=37.95 ; c'est pourquoi le seuil de positivité pour le diagnostic EF est fixé par mesure de précaution à Ct < 37 (voir tableau p.14).

L'extraction de l'ADN fongique a été réalisée par lyse et homogénéisation mécanique, et à l'aide du kit d'extraction EZ1 Mini kit (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur.

Seuil de détection

La sensibilité analytique a été déterminée par des dilutions en série d'ADN extrait de cultures pures de dermatophytes pour chaque canal cible de cet Eurobioplex. La concentration d'ADN extrait a été quantifiée sur Nanodrop 2000, Spectrophotomètre (Thermo Scientific).

La sensibilité est exprimée en pg ADN/microl et en équivalents génome/microl dans le tableau ci-dessous ; sachant que 0.1pg ADN correspond à 2.5-3.3 génomes compte-tenu de la taille moyenne des génomes dermatophytes (Arabatzis et al., 2007).

Espèce de l'échantillon	Limite de détection	
	Conc. limite pg ADN/microl	Equivalents Genome/microl
<i>Microsporum canis</i> (MC)	0.55	13.75 – 18.15
<i>Trichophyton interdigitale</i> (TI)	0.60	15 - 20
<i>Trichophyton rubrum</i> (TR)	4.57	114 - 151
<i>Trichophyton tonsurans</i> (TT)	0.005	0.125 – 0.165
<i>Epidermophyton floccosum</i> (EF)	0.41	10 – 13.53

BIBLIOGRAPHIE

Arabatzis M., Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Kuijper EJ, de Hoog GS, Lavrijsen AP, Templeton K., van der Raaij-Helmer EM, Velegraki A., Gräser Y., Summerbell RC. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme; Br J Dermatol. 2007 157 (4): 681-9.

Paugam A., L'Ollivier C., Viguié C., Anaya L., Mary C., de Ponfily G., Ranque S. Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. Journal of Microbiological Methods November 2013 95(2):218-222

Ghannoum M, Mukherjee P, Isham N, Markinson B, Rosso JD, Leal L. Examining the importance of laboratory and diagnostic testing when treating and diagnosing onychomycosis. Int. J. Dermatol. 2017 1365-4632

Brasch J; Müller S; Gräser Y. Unusual strains of *Microsporum audouinii* causing tinea in Europe. Mycoses Subsets 2015 1439-0507

Chandran, Nisha Suyien; Pan, Jiun-Yit; Pramono, Zacharias AD; Tan, Hiok-Hee; Seow, Chew-Swee. Complementary role of a polymerase chain reaction test in the diagnosis of onychomycosis. Australasian. Journal of Dermatology. May 2013, Vol. 54 Issue 2, p105-108. 4p.

Pontes ZB; Oliveira AC; Guerra FQ; Pontes LR; Santos JP. Distribution of dermatophytes from soils of urban and rural areas of cities of paraiba state, brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo; Nov/Dec 2013, Vol. 55 Issue 6, p377-382, 7p

Miklic P., Skerlev M., Budimcic D., Lipozencic J. The Frequency of Superficial Mycoses According to Agents Isolated During a Ten-Year Period (1999-2008) in Zagreb Area, Croatia. Acta Dermatovenereologica Croatica; Vol.18 No.2:92-98; ISSN 1847-6538

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

ELIMINATION DES DECHETS

Éliminer tous les déchets conformément à la législation sur les DASRI.

SYMBOLES

REF

Référence

LOT

Numéro de lot



Limites de température de conservation



Date d'expiration



Contenu suffisant pour « N » réactions



Conserver à l'abri de la lumière



Fabricant



Mode d'emploi

CE

Produit marqué CE

IVD

In vitro diagnostic



eurobio
SCIENTIFIC

7, avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE



EurobioPlex
Dermatophytes
REAL-TIME PCR

For **qualitative** real-time PCR

REF EBX-023



48/96/192 reactions



Validated on:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Biorad) with analysis on CFX Manager v 3.1 (Biorad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche) with analysis on LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)

V. 1.01

Storage conditions:

Keep all reagents between -15°C and -22°C until use and after first use



Instructions for use

TABLE OF CONTENTS

Intended use	22
Introduction	22
Principle of detection	23
Description and content of the kit	24
Storage	25
Cautions and notes	26
Samples collection, transport and storage	26
Procedure	27
I- DNA extraction	27
II- Real-time PCR procedure	27
II-1/ Diagram of the procedure	28
II-2/ Detailed procedure	29
Validation of the experiment	30
Data analysis and Interpretation	32
Performance analysis.....	34
Bibliography	37
Waste disposal	37
Symbols	38

INTENDED USE

The Dermatophytes test uses real-time polymerase chain reaction (PCR) amplification, and is designed for the qualitative detection of the six most frequently involved dermatophytes in superficial cutaneous mycosis of the skin, hair and nails (dermatophytoses): *Trichophyton rubrum/violaceum* (undifferentiated detection of these two species), *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophyte* var. *interdigitale*, *Microsporum canis*, and *Epidermophyton floccosum*, from a DNA extract. This test is indicated to confirm a diagnosis of presumption of infection in patients or complete a proven or indeterminate diagnosis by other techniques such as direct examination and culture (identification according to the time of growth, macroscopic and microscopic examinations). Extracted DNA is the starting material for the Eurobioplex Dermatophytes kit.

The Eurobioplex Dermatophytes has been validated on the following specimen:

- Pure cultures of dermatophytes fungi isolated from clinical samples
- Mycological clinical samples (swabs rubbed on the scalp, nails, skin, hair and dander)

INTRODUCTION

Dermatophytes are filamentous fungi belonging to the genera *Microsporum* (M.), *Trichophyton* (T.), and *Epidermophyton* (E.). They have an affinity for the keratin of skin, hair, and nails producing various clinical forms: lesions of the skin or epidermophytoses, tinea capitis for injury of the scalp, folliculitis for the invasion of the hair by a dermatophyte, onychomycosis for nail affection. The onychomycosis are disorders frequently encountered in dermatology and constitute up to 50% of the onychopathies. Their prevalence is increasing in recent years.

Many pathogens can be the cause of these dermatophytoses. They are characterized by various spore productions, and are divided into 3 groups:

1 / anthropophiles, exclusive human parasites, transmitted by direct contact, clothes, ground. *T. rubrum* is the most common (found in 70-90% of the dermatophytosis), followed by *T. mentagrophyte interdigitale* and *T. tonsurans* that belong to the *T. mentagrophyte* complex. *T. violaceum*, which belongs to the *T. rubrum* complex, and *E. floccosum* are also part of anthropophiles species.

2 / anthrozoophiles, that are transmitted to humans by a contaminated animal (claws, hair; ex: *M. canis*, *M. equinum*, *M. gallinae*, *M. persicolor*, *T. equinum*, *T. mentagrophyte* var. *mentagrophyte*, *T. sarkisovii*, *T. simmii* and *T. verrucosum*). *M. canis*, transmitted by cats, is the most common of this group and is the second most frequent pathogen.

3 / geophiles or telluric found on the ground (ex: *T. terrestre*, *M. gypseum*).

The frequency of each species varies depending on the country. In Northern Europe and North America, the main pathogens are *M. canis* and *T. rubrum*. Zoophiles dermatophytes are more common in Southern Europe and in Arabic countries. The main species found in metropolitan France are *T. rubrum* and *T. mentagrophyte* var. *interdigitale*.

There is no precise diagnosis for the identification of the dermatophyte responsible for the affection of keratin by the clinician. Diagnosis often does not allow differentiating species due to the morphological similarities of some of these dermatophytes. In case of suspected mycosis, a mycological sample with direct examination and culture is systematically done and even mandatory and ideally prior to any treatment. The treatment must be local in all cases and general and extended in cases of affection of the hair and nails. It is generally initiated without waiting for the results of the macro- tests (color and texture) and the post culture microscopic analysis (aspect of the filaments and spores) that last 3 to 5 weeks. Dermatophytes growth on Sabouraud media form filaments (mycorrhizal) and spores from an asexual reproduction called conidia. Depending on their genera, these fungi can produce microconidia (*M. spp*, *T. spp*) or not (*E. floccosum*). Therefore, an accurate diagnosis would permit to avoid additional costs and time lost because the treatment may be inefficient following a false diagnosis. The knowledge of the species allows specifying the origin of the contamination.

The test of gene amplification by polymerase chain reaction (PCR) is the fastest and most specific technique for the targeted diagnostics of dermatophytes. Although dermatophytes DNA present a strong homology of sequence, the multiplex EBX-023 allows amplifying specific DNA of the following dermatophytes: *T. rubrum/violaceum* (undifferentiated detection), *T. tonsurans*, *M. canis*, *T. mentagrophyte interdigitale*, and *E. floccosum*.

PRINCIPLE OF DETECTION

The Eurobioplex Dermatophytes is a test using real-time amplification of fungal DNA of *T. rubrum/violaceum* (undifferentiated detection of these two species), *T. tonsurans*, *M. canis*, *T. mentagrophyte interdigitale*, and *E. floccosum*, as well as a DNA extraction and PCR inhibition control. The test is performed from the DNA extracted from a sample using two reactions in two wells/tubes.

The DNA extraction and PCR inhibition control allows to check for variations that may occur during the DNA extraction step of biological samples and real-time PCR amplification. Thus, it ensures that a negative result may not be due to a bad DNA extraction and/or due to the presence of PCR inhibitors in too large quantities.

This kit contains two different oligomixes which permit to detect the different pathogens listed below:

Oligomix 1: *M. canis* (MC), *T. mentagrophyte interdigitale* (TI) + control of DNA extraction and PCR inhibition (CI-PCR);

Oligomix 2: *T. rubrum/violaceum* (TR + TV; undifferentiated detection), *T. tonsurans* (TT), and *E. floccosum* (EF) + control of DNA extraction and PCR inhibition (CI-PCR).

DNA of MC and TI is respectively detected using FAM and HEX labeled probes. DNA of (TR + TV) is detected using a FAM labeled probe, and DNA of TT and EF is respectively detected using HEX and Texas Red labeled probes. For the two multiplexes, DNA extraction and PCR inhibition control is detected using a CY5 labeled probe. All probes emit a specific fluorescence following their hydrolysis during the elongation of the amplification product. The measurement of the intensities of real-time fluorescence correlates with the accumulation of specific amplification products.

DESCRIPTION AND CONTENT OF THE KIT

The real-time PCR Dermatophyte kit is ready to use for the specific detection of *T. rubrum/violaceum* (undifferentiated detection), *T. tonsurans*, *M. canis*, *T. interdigitale*, and *E. floccosum*.

Fluorescence is emitted and individually recorded through optical measurements during the PCR. The detection of the amplified fragment is performed by a fluorimeter using the channels shown in Table 1 below.

The kit contains reagents and enzyme for the amplification of DNA of these fungi, and the DNA extraction and PCR inhibition control (see Table 2)

3 sizes are available for this kit:

- 48 reactions to test 22 patients samples with the two oligomixes
- 96 reactions to test 46 patients samples with the two oligomixes
- 192 reactions to test 94 patients samples with the two oligomixes.

Table 1 : Pathogens detected by each oligomix

Target	Oligomix 1	Oligomix 2	Fluorophore
<i>Microsporum canis</i>	X	-	FAM
<i>Trichophyton interdigitale</i>	X	-	HEX
<i>Trichophyton rubrum</i> + <i>Trichophyton violaceum</i>	-	X	FAM
<i>Trichophyton tonsurans</i>	-	X	HEX
<i>Epidermophyton floccosum</i>	-	X	Texas Red
PCR inhibition control (CI-PCR)	X	X	Cy5

Wavelengths of excitation/emission for FAM (495/515 nm), HEX (535/555 nm), Texas Red (585/605 nm), CY5 (647/667 nm).

Equivalent channels on different real time PCR cyclers:

- Channel **FAM** (ABI Systems, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systems Mx), Channel 510 (LC 480), Channel Green (RotorGene)
- Channel **HEX** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems), Channel VIC (ABI Systems), Channel Alexa532 (SmartCycler II), Channel 580 (LC 480), Channel Yellow (RotorGene),
- Channel **Texas Red**: LC Red 610 (LC480), Channel Orange (RotorGene)
- Channel **Cy5** (ABI Systems, Chromo 4/CFX96, Mx Systems), Channel 660 (LC 480), Channel Alexa647 (SmartCyclerII), Channel Red (RotorGene)

Note: On LC480 instrument II, apply color compensation for the following channels: FAM-HEX/VIC-TexasRed-Cy5 (465-510, 533-580, 533-610, 618-660).

Table 2:

Cap color	Components of the kit	192 reactions	96 reactions	48 reactions	Reconstitution
Red	Enzyme	8 x 375 µl	4 x 375 µl	2 x 375 µl	Ready to use
Transparent	Oligomix 1	4 x 210 µl	2 x 210 µl	210 µl	Ready to use
Green	Oligomix 2	4 x 210 µl	2 x 210 µl	210 µl	Ready to use
Blue	Water = negative control (CN-H ₂ O)	1 ml	1 ml	1 ml	Ready to use
Yellow	Positive Control Dermatophytes 1 (CP1)	4 x 40 µl	2 x 40 µl	40 µl	Ready to use
Orange	Positive Control Dermatophytes 2 (CP2)	4 x 40 µl	2 x 40 µl	40 µl	Ready to use
White	PCR inhibition control (CI-PCR)	4 x 300 µl	2 x 300 µl	300 µl	Ready to use

Oligomix1: contains the primers and probes of the triplex MC+TI+CI-PCR

Oligomix2: contains the primers and probes of the quadriplex (TR+TV)+TT+EF+CI-PCR

Required material not provided:

- ◇ Biological Hood
- ◇ Real-time PCR instrument
- ◇ Micro centrifuge
- ◇ Vortex
- ◇ Plates / tubes for real-time PCR
- ◇ Micropipettes
- ◇ DNase-free RNase-free filter tips for micropipettes
- ◇ Sterile microtubes
- ◇ Gloves (powder free)

STORAGE

All reagents must be stored between -15 and -22°C.

All reagents can be used until the expiration date indicated on the kit.

Many freezing / defrosting cycles (> 3x) must be avoided, and could lead to decrease in sensitivity.

CAUTIONS AND NOTES

Read carefully instructions before starting.

- ◇ The experiment must be performed by competent staff.
- ◇ Instruments must have been properly installed, calibrated and maintained according to the manufacturer's recommendations.
- ◇ Clinical samples are potentially infectious and must be processed under a laminar flow hood.
- ◇ The experiment must be performed according to good laboratory practices.
- ◇ Do not use this kit after expiration date.
- ◇ The kit is shipped with dry ice, and the components of the kits must arrive frozen. If one or more components are defrosted, or if the tubes have been damaged, contact Eurobio Scientific.
- ◇ Once defrosted, spin down briefly the tubes before use.
- ◇ Use of ice or cooling block is advised in case of long delay due for instance to large number of samples or high temperature.
- ◇ It is recommended to define three working areas: 1) Isolation of DNA, 2) Preparation of the reaction mix and 3) Amplification / Detection of amplified products.
- ◇ Use specific lab coat and gloves (powder free) in each working area.
- ◇ Pipettes, reagents and other materials must not cross each area.
- ◇ Specific caution is required to preserve the purity of the reagents and reaction mixtures.
- ◇ Appropriate methods of preparation/extraction of DNA to produce high quality DNA and to be followed by a real-time PCR application should be used, particularly avoiding all sources of DNase contamination.
- ◇ Always use RNase-free DNase-free filtered tips for micropipettes.
- ◇ Do not pipette with mouth and do not eat, drink or smoke in the area.
- ◇ Avoid sprays.

SAMPLES COLLECTION, TRANSPORT AND STORAGE

- ◇ Collect samples in sterile containers (for example: Petri dish).
- ◇ It is the responsibility of the user to master its own conditions of collection, transport and storage of samples, and extraction of DNA by suitable systems to produce DNA of good quality.
- ◇ It is recommended that samples be stored according to the recommendations of storage of samples before extraction (Table 3).

Table 3 :

Recommendations of maximum storage of samples before extraction	
Room temperature	1 month

- ◇ The user can refer to the World Health Organization or High Health Authority for storing samples.
- ◇ Transport of clinical samples must follow local regulations for this type of infectious agents.

PROCEDURE

I- DNA extraction

It is the user's responsibility that the extraction system used be compatible with downstream types of specimen and real time PCR technology. For this kit, you can use your own extraction technique or a suitable commercial system by referring to the manufacturer's instructions. Generally commercial kits for skin or nail samples use a pre-treatment consisting of an incubation under agitation of the sample in the presence of lysis buffer, of proteinase K, and/or silica beads, sometimes followed by an homogenization. The DNA must then be extracted.

The kit is intended for use on extracted DNA, and it is the user responsibility to validate his extraction method of choice.

In the Dermatophytes kit, CI-PCR on the CY5 channel can be added before extraction or in the PCR reaction. It ensures that a negative result is not due to an extraction problem or due to the presence of PCR inhibitors at high quantity. We recommend the addition of 10 µl of CI-PCR per extraction. Then, add 5µl/reaction of PCR from a final volume of elution of 50µl after extraction. If the CI-PCR is added to control the real-time PCR, CI-PCR is added to the reaction mix (1 µl per PCR reaction). See real-time PCR protocol for details.

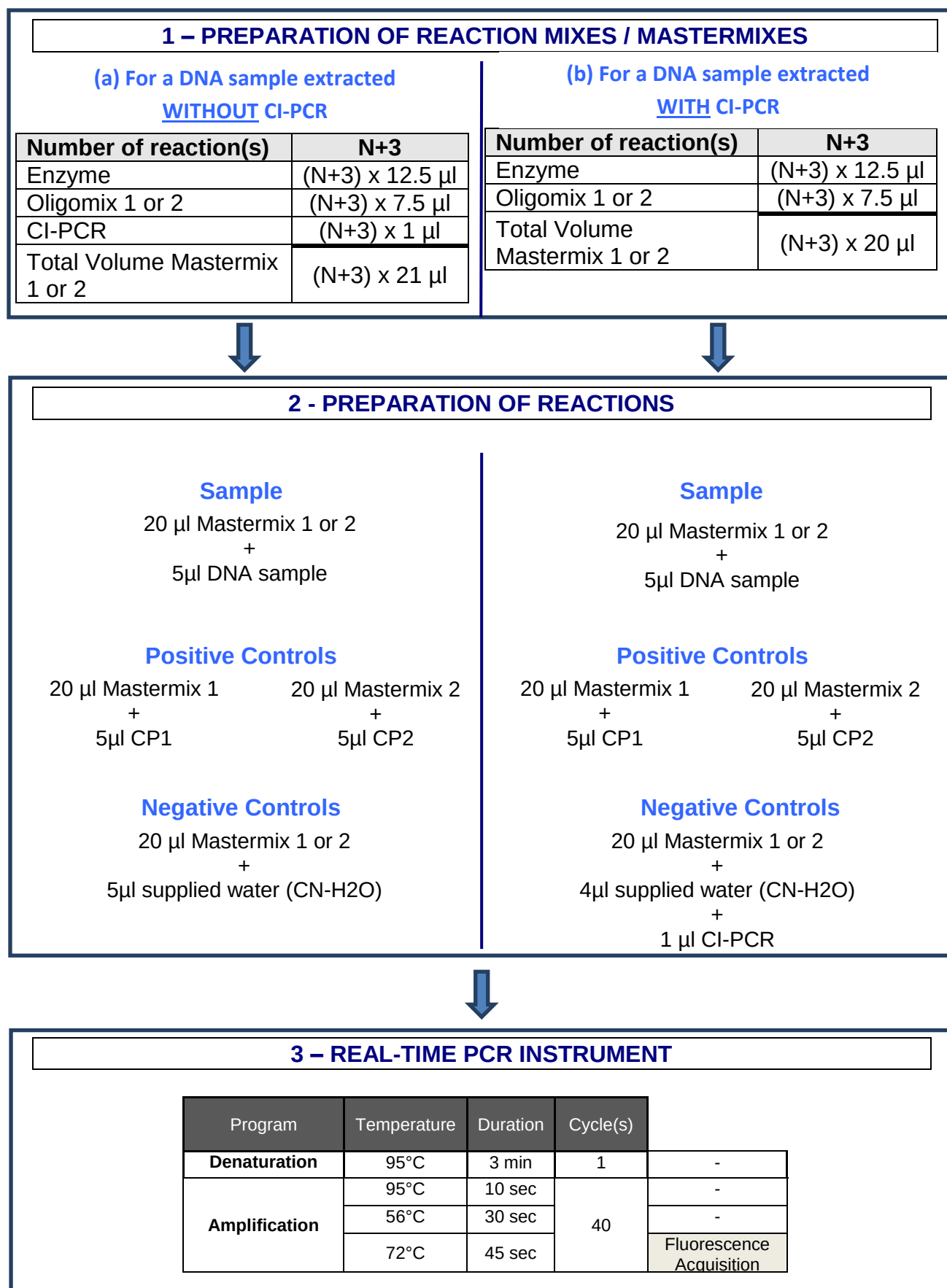
CI-PCR is also available separately from Eurobio Scientific (Ref EurobioPlex EBX-002).

II- Real-time PCR procedure

General comment:

The Dermatophytes Positive Controls CP1 and CP2, and the DNA extraction and PCR inhibition control (CI-PCR) contain a very high concentration of matrix. Manipulations must be performed carefully to avoid contamination. To control the functioning of the PCR and steps of extraction and real-time PCR amplification, it is necessary to test the CP1 and CP2 positive controls with the corresponding oligomix, as well as a negative control (water supplied = CN-H₂O + CI-PCR) (see II-2/6) of real-time PCR procedure).

II-1/ Diagram of the procedure



II-2/ Detailed Procedure

- 1) Homogenize the tube of Enzyme, and vortex Oligomix 1, Oligomix 2, CP1, CP2, and CI-PCR tubes before starting, and centrifuge.
- 2) Prepare Mastermixes 1 and 2 as below; N is the number of PCR reactions. Plan to prepare enough reagents for at least N+3 reactions (refer to part 1-(a) or 1-(b) of the previous diagram according to the case).

Case (a): for a DNA sample extracted without CI-PCR

Number of reaction(s)	1	N+3
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix 1 or 2	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl
CI-PCR	1 µl	(N+3) x 1 µl
Total Volume Mastermix 1 or 2	21 µl*	(N+3) x 21 µl

Case (b): for a DNA sample extracted WITH CI-PCR

Number of reaction(s)	1	N+3
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix 1 or 2	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl
Total Volume Mastermix 1 or 2	20 µl*	(N+3) x 20 µl

* The volume difference between case (a) or (b) has no effect on performance.

- 3) Homogenize the mastermixes prepared in 2) and centrifuge briefly
- 4) Distribute 20 µL Mastermix* 1 or 2 using a micropipette and filtered tips in each tube or well of microplate for real time PCR.
- 5) Add 5 µL of extracted DNA sample.
- 6) In parallel, test the following controls:
 - Positive controls:
 - 20µL of mastermix 1 + 5µL of CP1
 - 20µL of mastermix 2 + 5µL of CP2
 - Negative controls:
 - Case (a): for a DNA sample extracted without CI-PCR
 - 20 µL mastermix 1 + 5 µL supplied water (CN-H₂O)
 - 20 µL mastermix 2 + 5 µL supplied water (CN-H₂O)
 - Case (b): for a DNA sample extracted with CI-PCR
 - 20 µL mastermix 1 + 4 µL water supplied (CN-H₂O) + 1 µL CI-PCR
 - 20 µL mastermix 2 + 4 µL water supplied (CN-H₂O) + 1 µL CI-PCR
- 7) Close immediately with an adhesive film or transparent caps to avoid contamination.
- 8) Centrifuge briefly to collect all the PCR reaction mix at the bottom of the tubes or plate.
- 9) Program the real-time PCR instrument as follows.

Program	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Denaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	40	-
	56°C	30 sec		-
	72°C	45 sec		Fluorescence Acquisition

Note 1: On LightCycler ® 480 systems (Roche), two optical systems are available: only "System II" is compliant with use of the kit. Apply color compensation for the following channels: FAM-HEX/VIC-TexasRed-Cy5 (465-510, 533-580, 533-610, 618-660).

Note 2: For the Applied Biosystems systems, select "NONE" in "PASSIVE REFERENCE".

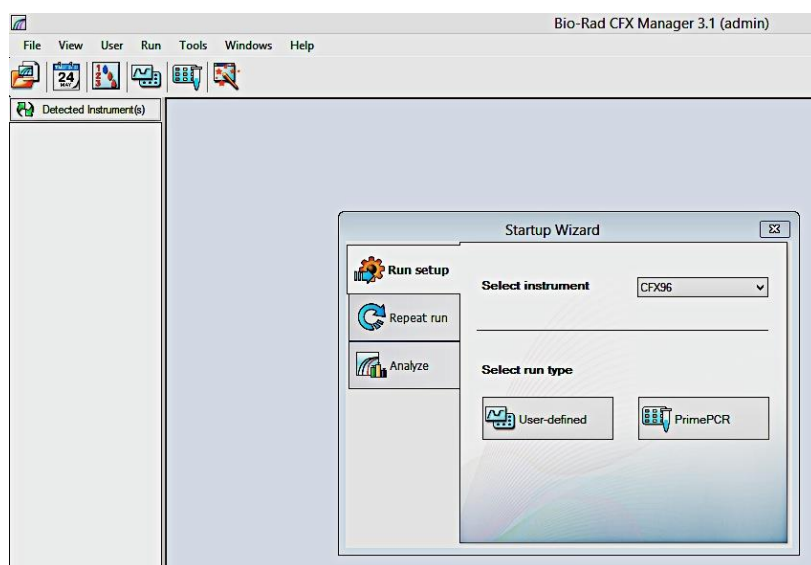
Note 3: On Rotorgene ™, please calibrate the signal by clicking on "GAIN optimization".

Note 4: On CFX96 (Biorad), start the run using the v1.6 or later version of CFX Manager software, and analyse with v 3.1 (see § Validation of the Experiment)

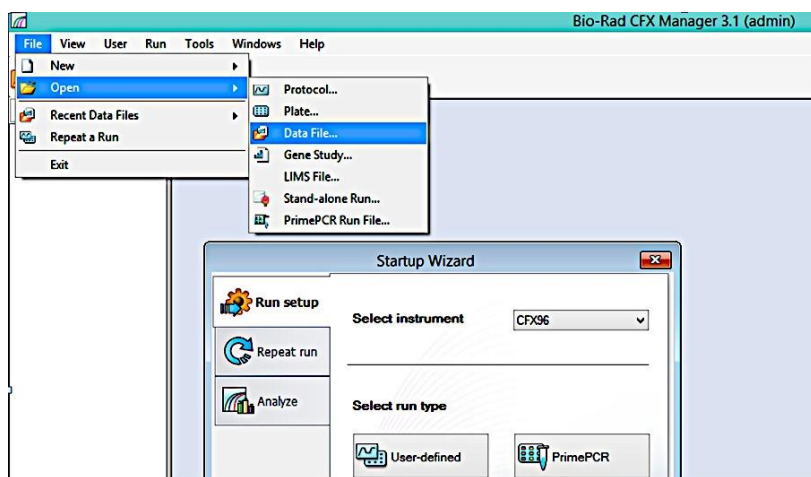
VALIDATION OF THE EXPERIMENT

The analysis of data post-acquisition on a CFX96 PCR instrument (Biorad) must be done with version 3.1 of CFX Manager Software (Biorad). In order to use this v3.1 version from a run started with an older version, follow the procedure below: at the end of the run, the data file with .pcrd suffix must be open and treated with version 3.1 of CFX Manager (Biorad).

If the run was done with CFX Manager v1.6 for instance, to open the data file with CFX Manager v3.1, click on CFX Manager v3.1 icon. The screen below appears.

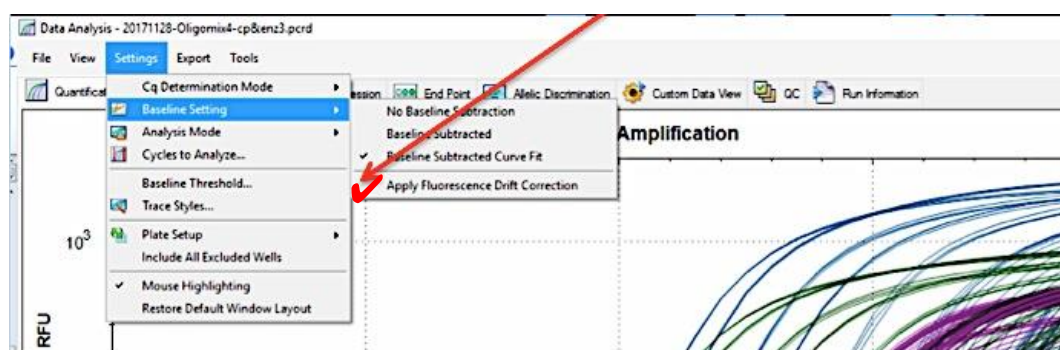


- Click on File and select Open, then Data File



- Select the file you want to analyze and click on Open.

The « drift correction » option must be selected from the « Settings » Tab, as indicated on the image below: click on « Settings », then « Baseline Setting » then on « Apply Fluorescence Drift Correction ».



Once this is done, the analysis can start.

For the assay to be valid, the results for the controls must be the following (Table 4). Otherwise, the experiment is not valid.

Table 4:

Positive Controls		
Channel	CP1	CP2
FAM	POSITIVE (Ct ≤ 40)	POSITIVE (Ct ≤ 40)
HEX	POSITIVE (Ct ≤ 40)	POSITIVE (Ct ≤ 40)
TEXAS RED	Not applicable	POSITIVE (Ct ≤ 40)
Negative Controls		
Channel	Negative Control Mastermix 1	Negative Control Mastermix 2
FAM	Undetermined	Undetermined
HEX	Undetermined	Undetermined
TEXAS RED	Not applicable	Ct ≥ 37 or undetermined
CY5	POSITIVE (Ct ≤ 40)	POSITIVE (Ct ≤ 40)

CP1: Dermatophytes Positive Control for Multiplex 1

CP2: Dermatophytes Positive Control for Multiplex 2

DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

DNA extraction and PCR inhibition control in biological samples:

Two results can be obtained:

1/ the DNA extraction and PCR inhibition control (CI-PCR; channel Cy5) test is positive: DNA has been properly extracted, and there is no PCR inhibitor. The result can be validated.

2/ the DNA extraction and PCR inhibition control (CI-PCR; channel Cy5) test is negative: either DNA was not extracted, the PCR did not work well, or the presence of PCR inhibitors inhibits the PCR reaction. It is then recommended to repeat the extraction or dilute the sample, unless a specific signal appears in the targeted channels (FAM, HEX, Texas Red).

OLIGOMIX 1:

For clinical samples tested with the Oligomix 1, the following results are possible:

*** Ct cut off for positivity of samples:**

Channel FAM *Microsporium canis* : + Positive => Positive Ct (≤ 40)

Channel HEX *Trichophyton interdigitale* : + Positive => Positive Ct (≤ 40)

PCR Signal			Presence of MC	Presence of TI	Test validity/comment
FAM	HEX	CY5			
+	+	+	Yes	Yes	valid
+	-	+	Yes	No	valid
-	+	+	No	Yes	valid
-	-	+	No	No	valid
+	+	-	Yes	Yes	Valid: Possible inhibition of PCR or problem with extraction that does not prevent the detection of MC and TI.
+	-	-	Yes	No possible interpretation	Valid for MC: Possible inhibition of PCR or problem with extraction that does not prevent the detection of MC Not valid for TI: Possible inhibition of PCR or problem with extraction that would prevent the detection of TI → dilute 5 x the sample. If necessary redo an extraction.
-	+	-	No possible interpretation	Yes	Valid for TI: Possible inhibition of PCR or problem with extraction that does not prevent the detection of TI Not valid for MC: Possible inhibition of PCR or problem with extraction that would prevent the detection of MC → dilute 5 x the sample. If necessary redo an extraction.
-	-	-	No possible interpretation	No possible interpretation	Not valid: Inhibition of PCR or problem with extraction - dilute first 5 x the sample ; if necessary redo an extraction

MC : *Microsporium canis*; TI : *Trichophyton interdigitale*

OLIGOMIX 2:

For clinical samples tested with the Oligomix 2, the following results are possible:

* Ct cut off for positivity of samples:

channel FAM-TR+TV: + Positive => Positive Ct (≤ 40)

channel HEX-TT: + Positive => Positive Ct (≤ 40)

channel Texas Red-EF: + Positive => Positive Ct and < 37

PCR Signal				Presence of TR or TV	Presence of TT	Presence of EF	Test validity/comment
FAM	HEX	Texas Red	CY5				
+	+	+	+	Yes	Yes	Yes	VALID
+	+	-	+	Yes	Yes	No	
+	-	+	+	Yes	No	Yes	
-	+	+	+	No	Yes	Yes	
+	-	-	+	Yes	No	No	
-	+	-	+	No	Yes	No	
-	-	+	+	No	No	Yes	
-	-	-	+	No	No	No	
+	+	+	-	Yes	Yes	Yes	Valid: Possible inhibition of PCR or problem with extraction that does not prevent the detection of TR or TV, TT and EF
+	-	-	-	Yes	No possible interpretation	No possible interpretation	Possible PCR inhibition that does not prevent the detection of one or several pathogens (noticed by "Yes") ; valid for this pathogen(s) BUT possible PCR inhibition that would prevent the detection of other targeted pathogen(s) → dilute 5 x the sample; if necessary redo an extraction.
-	+	-	-	No possible interpretation	Yes	No possible interpretation	
-	-	+	-	No possible interpretation	No possible interpretation	Yes	
+	+	-	-	Yes	Yes	No possible interpretation	
+	-	+	-	Yes	No possible interpretation	Yes	
-	+	+	-	No possible interpretation	Yes	Yes	
-	-	-	-	No possible interpretation	No possible interpretation	No possible interpretation	Not valid: Possible inhibition of PCR or problem with extraction - dilute first 5 x the sample ; if necessary redo an extraction

TR+TV : *Trichophyton rubrum* + *Trichophyton violaceum* (cross detection for the two species)

TT : *Trichophyton tonsurans*

EF : *Epidermophyton floccosum*

Note that because of the strong nucleic homology observed between dermatophytes, positive results do not exclude the possibility of co-infection by other dermatophytes species which have not been specifically targeted at the development of this kit.

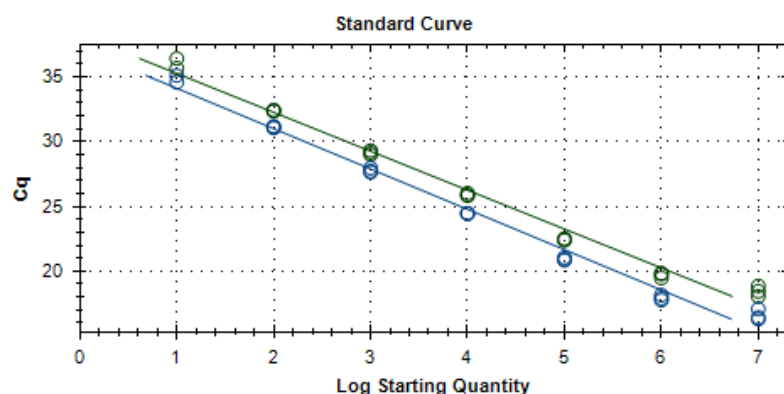
For example, it is possible that:

- some strains of the *Arthroderma otae* complex such as *M. ferrugineum* and *M. equinum*, may be recognized by the system of detection of *M. canis*,
- *T. soudanense*, *T. gourvilii*, *T. circonvolutum* may be recognized by the design of *T. rubrum*. *T. rubrum* presents a cross-detection demonstrated with *T. violaceum*,
- *T. equinum* may be recognized by *T. tonsurans*,
- *Arthroderma benhamiae*, *Arthroderma vanbreuseghemii* may be recognized by the design of *T. mentagrophyte interdigitale*.

PERFORMANCE ANALYSIS

Example of experiment performed on real-time PCR thermocycleur CFX96 (Biorad):

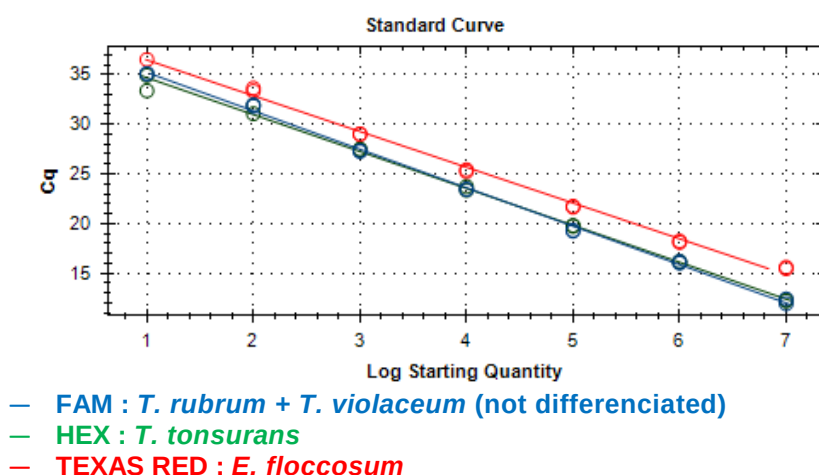
With Oligomix 1:



- FAM : *M. canis*

- HEX : *T. interdigitale*

With Oligomix 2:



Variability of the signal

	Dermatophytes species	WITHIN EXPERIMENT CV average (%)	BEETWEEN EXPERIMENTS CV average (%)
Oligomix 1	MC	0.70	5.59
	TI	0.81	6.64
Oligomix 2	TR+TV	0.77	1.67
	TT	0.88	2.36
	EF	0.75	1.87

CV : Coefficient of Variation

Validation on clinical samples

Specificity and sensitivity were analyzed from 66 DNA samples extracted from mycological clinical samples (swabs rubbed on the scalp, nails, skin, hair and dander), or extracted from pure cultures of dermatophytes, isolated clinical samples and identified by macro and microscopic morphological analysis, MALDI-TOF mass spectrometer, and sequencing of the rRNA ITS2 region from a Reference Laboratory.

The species covered in this analysis are the following

- *M.canis* (MC), n= 11
- *T. interdigitale* (TI), n= 12
- *T. rubrum* (TR) + *T.violaceum* (TV), n=29
- *T. tonsurans* (TT), n= 9
- *E. floccosum* (EF), n= 5

Several tests on DNA samples not diluted or diluted have been performed; this is summed up below.

The tests were performed on CFX96.

Detection of MC and TI:

		EBX-023 DERMATOPHYTES					
		MC			TI		
		POSITIVE	NEGATIVE	TOTAL	POSITIVE	NEGATIVE	TOTAL
Pretest	POSITIVE	11	0	11	10	2	12
	NEGATIVE	0	35	35	0	34	34
	TOTAL	11	35	46	10	36	46

Detection of TR+TV, TT and EF:

		EBX-023 DERMATOPHYTES								
		TR+TV			TT			EF		
		POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL
Pretest	POS	29	0	29	9	0	9	5	0	5
	NEG	0	28	28	0	48	48	0	52	52
	TOTAL	29	28	57	9	48	57	5	52	57

Specificity, Sensitivity and Concordance :

Targets	Specificity	Sensitivity	Concordance
<i>Microsporum canis</i>	> 99 %	> 99 %	> 99 % (n=46)
<i>Trichophyton interdigitale</i>	> 99 %	83.3 %	95.7 % (n=44/46)
<i>Trichophyton rubrum/violaceum</i> *	> 99 %	> 99 %	> 99 % (n=57)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	> 99 %	> 99 %	> 99 % (n=57)
<i>Epidermophyton floccosum</i>	> 99 %	> 99 %	> 99 % (n=57)

* cross detection between TR and TV

No cross reactivity was observed with the system of detection of :

- MC on TI, TT, EF, TR or TV samples,
- TI on MC, TT, EF, TR or TV samples,
- TV + TR on TT, EF or TI samples,
- TT on MC, TI, EF, TR or TV samples,
- EF on MC, TI, TT or TV samples,

A late non-specific amplification for an undiluted TR sample out of six tested was observed with a Ct = 37.95; that is why the threshold of positivity for the diagnosis of EF is Ct < 37 (see table p.33).

Fungal DNA extraction was done by lysis and mechanical homogenization, and using EZ1 Mini Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions.

Detection threshold

The analytical sensitivity was determined by serial dilutions of DNA extracted from pure cultures of dermatophytes for each target channel of this Eurobioplex. The concentration of extracted DNA was quantified by Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

The sensitivity is expressed in pg DNA/microl and equivalent genome/microl in the table below; 0.1pg DNA corresponds to 2.5 - 3.3 equivalent genomes (Arabatzis et al., 2007).

Dermatophytes Species	Detection threshold	
	Concentration pg DNA/microl	Equivalent Genome/microl
<i>Microsporum canis</i> (MC)	0.55	13.75 – 18.15
<i>Trichophyton interdigitale</i> (TI)	0.60	15 - 20
<i>Trichophyton rubrum</i> (TR)	4.57	114 - 151
<i>Trichophyton tonsurans</i> (TT)	0.005	0.125 – 0.165
<i>Epidermophyton floccosum</i> (EF)	0.41	10 – 13.53

BIBLIOGRAPHY

Arabatzis M., Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Kuijper EJ, de Hoog GS, Lavrijsen AP, Templeton K., van der Raaij-Helmer EM, Velegraki A., Gräser Y., Summerbell RC. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme; Br J Dermatol. 2007 157 (4): 681-9.

Paugam A., L'Ollivier C., Viguié C., Anaya L., Mary C., de Ponfily G., Ranque S. Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. Journal of Microbiological Methods November 2013 95(2):218-222

Ghannoum M, Mukherjee P, Isham N, Markinson B, Rosso JD, Leal L. Examining the importance of laboratory and diagnostic testing when treating and diagnosing onychomycosis. Int. J. Dermatol. 2017 1365-4632

Brasch J; Müller S; Gräser Y. Unusual strains of *Microsporum audouinii* causing tinea in Europe. Mycoses Subsets 2015 1439-0507

Chandran, Nisha Suyien; Pan, Jiun-Yit; Pramono, Zacharias AD; Tan, Hiok-Hee; Seow, Chew-Swee. Complementary role of a polymerase chain reaction test in the diagnosis of onychomycosis. Australasian. Journal of Dermatology. May2013, Vol. 54 Issue 2, p105-108. 4p.

Pontes ZB; Oliveira AC; Guerra FQ; Pontes LR; Santos JP. Distribution of dermatophytes from soils of urban and rural areas of cities of paraiba state, brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo; Nov/Dec2013, Vol. 55 Issue 6, p377-382, 7p

Miklic P., Skerlev M., Budimcic D., Lipozencic J. The Frequency of Superficial Mycoses According to Agents Isolated During a Ten-Year Period (1999-2008) in Zagreb Area, Croatia. Acta Dermatovenerologica Croatica; Vol.18 No.2:92-98; ISSN 1847-6538

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

WASTE DISPOSAL

Be in accordance with the law for the elimination of waste of clinical infectious material.

SYMBOLS

	Reference
	Batch number
	Limits of storage temperature
	Expiration Date
	Content sufficient for « N » reactions
	Keep protected from light
	Manufacturer
	Instructions for use
CE	CE labeled product
IVD	In vitro diagnostic



eurobio
SCIENTIFIC

7, avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE