



Bio-Evolution

COFFRET DE PCR EN TEMPS REEL

Dermatophytes

REF

BE-A995-CD

Σ 25

CE

IVD

Réactifs compatibles avec les systèmes de PCR en temps réel suivants :

Applied Biosystems® 7500; Smart Cycler® II Cepheid; Mx3000P/3005P
Agilent; Rotor-Gene® series Qiagen; Chromo4/CFX 96® Biorad;
LightCycler® 96/480 Roche.



Mode d'emploi

TABLE DES MATIERES

Table des matières	3
Utilisation	4
Introduction.....	4
Principe de la detection.....	5
Description du coffret	5
Contenu du coffret	6
Conservation	6
Matériels requis et non fournis.....	6
Précautions.....	7
Collection des échantillons, transport et conservation	7
Préparation des réactifs	8
Procédure	8
Extraction d'ADN	8
Contrôle cellulaire	8
Quantification.....	8
Protocole de PCR.....	9
Validation de l'expérimentation.....	12
Analyse des données et Interprétation.....	12
Analyse de performances.....	14
Bibliographie.....	15
Symboles	16
Notes	17
Notes	18

UTILISATION

Le coffret de PCR en Temps réel **Dermatophytes** est utilisé pour la détection de champignons Dermatophytes à partir d'échantillons d'ongles humains par un système d'amplification par PCR en temps réel.

INTRODUCTION

Les dermatomycoses, et plus particulièrement les onychomycoses, sont des infections fongiques très fréquentes. Dans la grande majorité des cas, elles sont dues à des Dermatophytes, champignons filamentueux comprenant plusieurs genres et espèces.

Cliniquement, les lésions d'onychomycose ne sont pas très spécifiques, et 50% des onychopathies ne sont pas d'origine fongique.

En cas de suspicion d'onychomycose, il est donc indispensable d'apporter la preuve de l'infection fongique avant d'entreprendre un traitement, car celui-ci repose sur l'administration, parfois prolongée d'antifongiques par voie générale. Ce traitement est coûteux et n'est pas exempt d'effets indésirables.

Le diagnostic mycologique permet une identification des espèces fongiques responsables mais le délai de réponse de la culture est de plusieurs semaines. De plus, il n'est sensible que s'il est réalisé sur des prélèvements effectués au niveau de la partie active de la lésion, contenant des filaments fongiques viables et cultivables. Pour ces raisons, ce diagnostic n'est pas toujours réalisé (ou réalisable) en pratique biologique courante.

L'introduction de techniques de biologie moléculaire permet de poser un diagnostic rapide d'une onychomycose due à un Dermatophage (quelle que soit l'espèce) par une mise en évidence rapide de l'ADN fongique à partir des prélèvements. Ce test peut être pratiqué sur un simple prélèvement d'ongle.

Ce coffret permet d'obtenir un résultat en 80 minutes (hors extraction d'ADN). Bien que le test n'autorise pas une identification des espèces de Dermatophytes, il représente une base diagnostique suffisante pour permettre la mise en place d'un traitement antifongique.

PRINCIPE DE LA DETECTION

Ce coffret repose sur une réaction d'amplification d'acides nucléiques spécifiques et une analyse en temps réel de l'activité 5' nucléase de l'ADN polymérase par un système optique de détection de la fluorescence.

Des réactions d'amplification spécifique d'un fragment du gène codant l'ARN ribosomal 5s des Dermatophytes et d'une région de la béta-actine humaine (contrôle cellulaire) sont réalisées à partir de l'ADN extrait de l'échantillon. La sonde spécifique de Dermatophytes est marquée par le fluorochrome FAM et émet une fluorescence spécifique suite à son hydrolyse au cours de l'elongation du produit d'amplification de Dermatophytes. La sonde spécifique du contrôle cellulaire est marquée par le fluorochrome HEX et émet une fluorescence spécifique suite à son hydrolyse au cours de l'elongation du produit d'amplification du contrôle cellulaire. La mesure des intensités de fluorescence en temps réel relate l'accumulation des produits d'amplification spécifiques, sans nécessiter de manipulation des amplicons après l'amplification.

Ce système d'amplification a été validé à partir d'échantillons d'ongles humains.

DESCRIPTION DU COFFRET

Le coffret de PCR en Temps réel **Dermatophytes** comporte un système prêt à l'emploi spécifique pour la **détection des Dermatophytes**. Le coffret contient les réactifs et les enzymes nécessaires à l'amplification de l'ADN de ces Dermatophytes. La fluorescence est émise et mesurée de façon individuelle par un système optique au cours de la PCR. La détection des fragments amplifiés d'ADN de Dermatophytes est réalisée par un fluorimètre en utilisant le **canal FAM***. Le marqueur d'extinction moléculaire est un marqueur non-fluorescent (black hole quencher) : **BHQ1**.

En parallèle, ce coffret contient un système pour déterminer la qualité de l'extraction de l'ADN en mesurant la fluorescence d'un contrôle cellulaire sur le **canal VIC****. Le marqueur d'extinction moléculaire est un marqueur non-fluorescent : **BHQ1**.

Un contrôle positif externe est fourni dans le coffret.

Note :

* : Canal FAM (Systèmes ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx), Canal 530 (LC 480), Canal Green (RotorGene Q)

**: Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 560 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene Q), Canal HEX (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx)

CONTENU DU COFFRET

Le Mix Dermatophytes contient le tampon, le chlorure de magnésium, les nucléotides triphosphates, l'ADN polymérase thermoactivable, les différentes amorces et sondes, ainsi que le Rox (utilisé comme référence passive).

Référence	Type de réactifs	Présentation (pour 25 réactions)
1	MIX	1 tube, 500 µL
2	MG WATER	1 tube, 500 µL
3	CONTROL +	1 tube, 30 µL (10^5 copies/ µL)

CONSERVATION

- Tous les réactifs doivent être stockés entre -28°C et -16°C. Une conservation à +4°C n'est pas recommandée.
- 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.
- Conserver tous les réactifs au frais pendant l'expérimentation.
- Le Mix Dermatophytes (tube ambré) doit être conservé à l'obscurité.

MATERIELS REQUIS ET NON FOURNIS

- Hotte biologique ;
- Appareil de PCR en temps réel ;
- Centrifugeuse de paillasse pour microtubes de type « Eppendorf » (max 16 000 g) ;
- Vortex ;
- Plaques / tubes pour réaction de PCR en temps réel ;
- Bloc réfrigérant ;
- Jeu de micropipettes (0,5 µL à 1000 µL) ;
- Embouts stériles à filtres pour micropipettes ;
- Microtubes stériles ;
- Poubelle pour déchets biologiques ;
- Gants non poudrés ;

- Réfrigérateur et congélateur ;
- Portoir pour microtubes.

PRECAUTIONS

Lire attentivement ces instructions avant de débuter la procédure.

- Cette expérimentation doit être réalisée par du personnel compétent.
- 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.
- Eviter les cycles de congélation / décongélation des réactifs, cela peut conduire à une baisse de la sensibilité du test.
- Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- L'utilisation de glace ou d'un bloc réfrigérant est conseillée.
- Définir trois zones de travail distincts :
 - 1) Isolation de l'ARN / ADN,
 - 2) Préparation du mélange réactionnel
 - 3) Amplification / Détection des produits amplifiés.
- Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces trois zones.
- Utiliser toujours des embouts stériles à filtre pour micropipettes.
- Porter des blouses et des gants distincts dans chaque zone de travail.
- Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- Eviter les aérosols.

COLLECTION DES ECHANTILLONS, TRANSPORT ET CONSERVATION

- Collecter les échantillons dans des tubes stériles.
- Les échantillons doivent être extraits immédiatement ou congelés de -20°C à -80°C.
- Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.

PREPARATION DES REACTIFS

L'ensemble des réactifs doivent être décongelés avant utilisation.

- **MIX** Ce réactif est prêt à l'emploi. Il doit être homogénéisé avant utilisation.
- **MG WATER** Ce réactif est prêt à l'emploi.
- **CONTROL +** Ce réactif est prêt à l'emploi. Il doit être homogénéisé avant utilisation.

PROCEDURE

EXTRACTION D'ADN

Des kits d'extraction d'ADN à partir d'ongles sont disponibles chez plusieurs fabricants. Vous pouvez utiliser votre propre système d'extraction ou une trousse commerciale adaptée. La trousse High Pure PCR Template Preparation kit (#11796828001, Roche Applied Science) est recommandée.

Concernant l'extraction d'ADN, merci de vous référer aux instructions du fabricant pour toute question complémentaire.

CONTROLE CELLULAIRE

L'amplification du contrôle cellulaire d'extraction permet à l'utilisateur de s'assurer de la performance du prélèvement et de l'extraction d'ADN. L'amplification sera contrôlée sur le **canal VIC**** de votre système de PCR en temps réel.

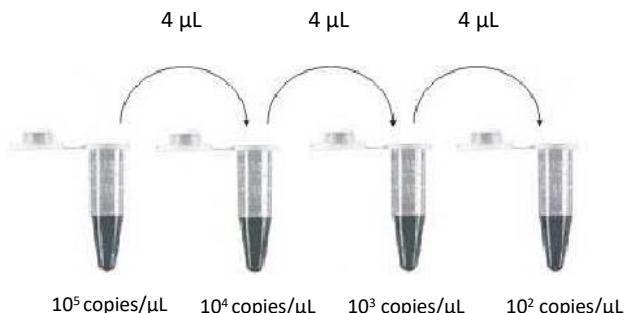
QUANTIFICATION

Cette trousse peut être utilisée pour la PCR **quantitative** ou **qualitative** en temps réel.

Pour une utilisation en PCR quantitative en temps réel, des dilutions de contrôle positif doivent être préparées comme indiqué ci-dessous. L'eau fournie doit être utilisée comme diluant. Une dilution supplémentaire n'est pas nécessaire pour une PCR qualitative en temps réel.

Prendre le contrôle positif (10^5 copies/ μL) comme le standard le plus élevé dans le premier tube. Respectivement, pipeter **36 μL** d'eau stérile dans trois autres tubes.

Réaliser trois dilutions comme suit :



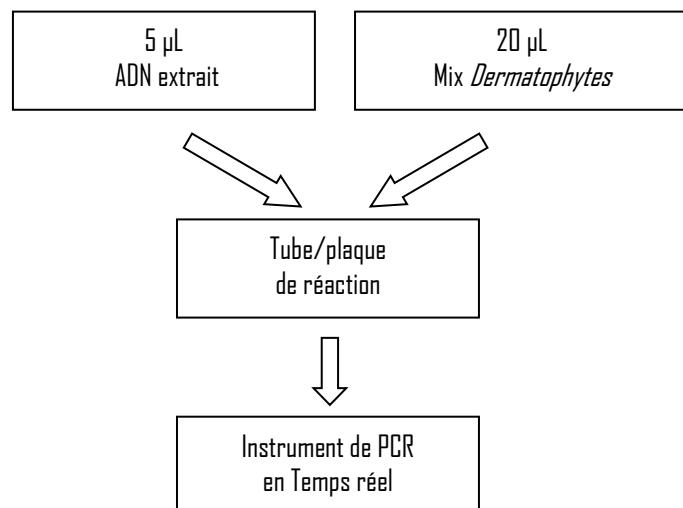
Pour générer une courbe standard sur un système de PCR en temps réel, les 3 dilutions standards et le contrôle positif doivent être utilisées et définies comme standard en spécifiant les concentrations correspondantes.

Attention :

- Bien homogénéiser le mélange avant transfert.
- Le contrôle positif (10^5 copies/ μL) contient une concentration élevée de matrice ADN. Les dilutions doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination.
- Les dilutions peuvent être conservées au maximum 24 h à +4°C.

PROTOCOLE DE PCR

Le mélange réactionnel doit être réalisé comme suit :



- 1) Homogénéiser le Mix *Dermatophytes* par retournement et centrifuger brièvement. Distribuer **20 µL** de Mix *Dermatophytes* à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre stériles dans chaque tube/puits de réaction pour PCR en temps réel. Séparément, ajouter **5 µL** d'échantillon d'ADN, de contrôles positif et négatif dans différents tubes/puits de réaction. Fermer immédiatement les tubes/puits pour éviter toute contamination.
- 2) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes/puits.
- 3) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR:

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	Acquisition de fluorescence
Activation ADN polymérase	95°C	30 sec	1	Non
Amplification	95°C	5 sec	40	Non
	60°C	40 sec		Canaux FAM* et VIC**
Refroidissement	37°C	1 sec	1	Non

- 4) Pour une utilisation sur un système ABI® Prism, vous devez indiquer « **none** » au niveau du **marqueur d'extinction moléculaire** et **ROX** pour la **référence passive**.

Pour le SmartCycler II, sélectionnez « **Dye Set** » : **FATA25** (canal FAM = FAM ; canal HEX = Alx532)

Pour une utilisation sur LC 480, sélectionner l'objet de compensation colorimétrique « **Universal FAM/VIC CC Object** » inclus par défaut dans le logiciel.

5) Exemples de plans de plaque

PCR qualitative :

	1	2	3	4	5
A			CONTROL +	Ech. 8	
B			Ech. 1	Ech. 9	
C			Ech. 2	Ech. 10	
D			Ech. 3		
E			Ech. 4		
F			Ech. 5		
G			Ech. 6		
H			Ech. 7	NTC	

PCR quantitative :

	1	2	3	4	5
A		CONTROL + 10^5 copies/ μ L	Ech. 1	Ech. 9	
B		CONTROL + 10^4 copies/ μ L	Ech. 2	Ech. 10	
C		CONTROL + 10^3 copies/ μ L	Ech. 3		
D		CONTROL + 10^2 copies/ μ L	Ech. 4		
E			Ech. 5		
F			Ech. 6		
G			Ech. 7		
H			Ech. 8	NTC	

Pour d'avantage d'informations relatives au paramétrage de votre thermocycleur et à l'analyse des données, vous pouvez contacter directement Bio-Evolution.

VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

Dans chacun des canaux (FAM* et VIC**), le seuil doit être positionné juste au-dessus du maximum de signal généré par le contrôle négatif.

Les valeurs de Ct pour les contrôles détectés dans le **canal FAM*** doivent être les suivantes :

- Contrôle négatif (eau) : Ct non déterminé (car en dessous du seuil de positivité fixé)
- Contrôle positif : Ct inférieur ou égal à 25

Les valeurs de Ct pour les contrôles détectés dans le **canal VIC**** doivent être les suivantes :

- Contrôle négatif (eau) : Ct non déterminé (car en dessous du seuil de positivité fixé)
- Contrôle positif : Ct inférieur ou égal à 32
- Echantillon : Un signal pour le contrôle cellulaire doit être détecté dans le **canal VIC**** pour chaque échantillon. Toutefois, pour des raisons de compétition, le signal peut ne pas être détecté en présence de quantités importantes d'ADN de Dermatophytes.

En dehors de ces valeurs, l'expérimentation ne peut être validée.

	Canal FAM	Canal VIC
Contrôle Négatif	Indéterminé	indéterminé
Contrôle Positif (10^5 copies/ μL)	$\text{Ct} \leq 25$	$\text{Ct} \leq 32$
Echantillon	Ct_{Ech}	$\text{Ct} \leq 38$

ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

Les résultats suivants sont possibles :

- 1) Un signal est détecté sur le canal FAM* et la valeur de Ct est inférieure ou égale à 38. **Le résultat est positif : l'échantillon contient de l'ADN de Dermatophytes.**
- 2) Un signal est détecté sur le canal FAM* mais la valeur de Ct est comprise entre 38 et 40. Il est nécessaire de relancer une analyse. Si le second test montre une valeur de Ct inférieure à 40, alors **le résultat peut être considéré comme positif : l'échantillon contient de l'ADN de Dermatophytes.**
- 3) Aucun signal sur le canal FAM*. Dans le même temps, un signal positif du contrôle cellulaire sur le canal VIC**. **L'échantillon ne contient pas d'ADN de Dermatophytes.** **L'échantillon peut être considéré comme négatif.**
- 4) Aucun signal détecté, ni sur le canal FAM*, ni sur le canal VIC**. **Aucun diagnostic ne peut être réalisé.** L'extraction d'ADN et/ou la réaction d'amplification d'ADN ont été inefficace. Il est recommandé de réextraire votre échantillon et de le réanalyser.

	Canal FAM	Canal VIC	Résultats	Vérifications
Echantillons	≤ 38	+/-	Positif <i>Dermatophytes</i>	Important : Pour des raisons de compétition, le signal du contrôle d'inhibition détecté sur le canal VIC peut être fortement affecté (voire indétectable) en présence de fortes quantité d'ADN de <i>Dermatophytes</i>
	38 < Ct < 40 répéte			
	-	-	Attention ! Possibilités : <ul style="list-style-type: none">• Inhibition• Erreur de manipulation• Défaillance du thermocycleur• Echantillon de mauvaise qualité	<ol style="list-style-type: none">1. Que les réactifs ont été préparés correctement2. Qu'il n'y a pas eu d'erreur de manipulation3. Que les bons canaux soient sélectionnés4. Que la programmation du thermocycleur est correcte5. Que le coffret a été stocké correctement6. Que la réaction ne contient pas d'inhibiteur de PCR7. Que l'extraction a été efficace
Contrôle +	-	≤ 38	Négatif <i>Dermatophytes</i>	
	≤ 25	≤ 32	Correct	
Contrôle -	Si l'une de ces situations se présente		Attention ! Possibilité d'erreur de pipetage ou de procédure	<ol style="list-style-type: none">1. Que les réactifs ont été préparés correctement2. Qu'il n'y a pas eu d'erreur de manipulation3. Que les bons canaux soient sélectionnés4. Que la programmation du thermocycleur est correcte5. Que l'espace de travail et les instruments sont décontaminés régulièrement6. Que le coffret a été stocké correctement
	- ou > 25	- ou > 32		

Pour toute question ou problème, merci de contacter votre support technique à contact@bio-evolution.fr

Note :

* : Canal FAM (Systèmes ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx), Canal 530 (LC 480), Canal Green (RotorGene Q)

**: Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 560 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene Q), Canal HEX (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx)

ANALYSE DE PERFORMANCES

Sensibilité analytique *Dermatophytes* : 25 copies/ μ L ;

Comparaison diagnostic classique (examen direct, culture, PCR-RFLP) et PCR temps réel Bio-Evolution

		qPCR Bio-Evolution		
		Positif	Négatif	Total
Méthode classique	Positif	41 (a)	0 (b)	41
	Négatif	4 (c)	31 (d)	35
	Total	45	31	76

Sensibilité clinique : $Sensibilité = a/(a+b) \times 100 = 41/(41+0) \times 100 = 100\%$

Spécificité clinique : $Spécificité = d/(c+d) \times 100 = 31/(4+31) \times 100 = 89\%$

Valeur Préditive Positive (VPP) : $VPP = a/(a+c) \times 100 = 41/(41+4) = 91\%$

Valeur Préditive Négative (VPN) : $VPN = d/(b+d) \times 100 = 31/(0+31) = 100\%$

BIBLIOGRAPHIE

Faggi E., Pini G., Campisi E. PCR Fingerprinting for Identification of Common Species of Dermatophytes. *J. of Clin. Microbiol.* 2002. Vol.40, No.12, 4804-4805.

Garg J., Tilak R., Garg A. Prakash P., Gulati A.K., Nath G. Rapid detection of dermatophytes from skin and air. *BMC Research Notes* 2009, **2**:60.

Gutzmer R., Mommert S., Küttler U., Werfel T., Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J. of Med.Microbiol.* (2004), **53**, 1207–1214.

Leibner-Ciszak J., Dobrowolska A., Krawczyk B., Kaszuba A., Staczek P. Evaluation of a PCR melting profile method for intraspecies differentiation of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *J. of Med. Microbiol.* (2010), **59**, 185–192.

Li H.C., Bouchara J.P., Ming-Long Hsu M., Barton R., Chang T.C. Identification of Dermatophytes by an Oligonucleotide Array. *J. of Clin. Microbiol.* 2007, Vol.45, No. 10 3160-3166.

Monod M., Bontems O., Zaugg C., Léchenne B., Fratti M., Panizzon R. Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *J. of Med. Microbiol.* (2006), **55**, 1211–1216.

Shehata A.S., Mukherjee P., K., Aboulatta H.N., El Akhras A.I., Abbadi S.H., Ghannoum M.A. Single-Step PCR Using (GACA) Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and Strains. *J. of Clin. Microbiol.* 2008 Vol.46, No.8, 2641-2645.

SYMBOLES

REF

Référence

LOT

Numéro de lot



Limite supérieure et inférieure de température de conservation



Date d'expiration



Contenu suffisant pour « N » réactions



Conserver à l'abri de la lumière



Fabricant

C E

Produit marqué CE

IVD

Diagnostic In Vitro



Mode d'emploi

MIX

Mix réactionnel

MG WATER

Eau de qualité moléculaire

CONTROL +

Contrôle positif

NOTES

NOTES



Bio-Evolution

Espace Villa Parc, l'Érable et le Chêne
1, avenue Marne et Gondoire 77600 Bussy-Saint-Martin
FRANCE
Tél. : +33 (0)1 60 03 81 50
Fax : +33 (0)1 60 03 81 20
contact@bio-evolution.fr