

DermaGenius® Resistance

(PN-303)

e

Kit de Extração PathoNostics

(PN-502)

Instruções de uso Versão 1.1E

Apenas para uso em pesquisa (RUO).

Para uso com os equipamentos LightCycler 480® II (Roche), Rotor-Gene® Q (Qiagen), CFX96™ (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) e Magnetic Induction Cycler (Mic qPCR cycler®; Sistemas biomoleculares)

PN-303			25
PN-502			50

 PathoNostics B.V., Randwycksingel 45, 6229 CE Maastricht, Países Baixos

Conteúdo

1.	Resumo e contextualização	3
2.	Utilização pretendida	3
3.	Princípio do ensaio	3
4.	Produtos e alvos.....	4
5.	Materiais fornecidos	4
6.	Materiais necessários, mas não fornecidos	5
7.	Precauções gerais.....	6
8.	Armazenamento e manuseamento de reagentes	7
9.	Armazenamento e manuseamento de amostras.....	8
10.	Extração de ácido nucleico.....	9
10.1.	Kit de Extração PathoNostics (PN-502) para amostras de unhas, cabelos e pele	9
10.2.	Extração de DNA para culturas	11
10.3.	Controle interno (CI)	12
10.4.	Controle positivo (CP)	12
11.	Configurações do instrumento de PCR em tempo real	12
12.	Procedimento.....	15
12.1.	Área 1: preparação da Master Mix	16
12.2.	Área 2: Adicionando DNA às misturas de PCR	16
12.3.	Área 3: Inicie o instrumento de PCR em tempo real.....	16
13.	Análise de dados	16
14.	Interpretação dos resultados	21
14.1.	Interpretação dos dados do kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR	21
14.2.	Controles	22
15.	Solucionando problemas.....	23
16.	Aviso ao Comprador	28
17.	Símbolos.....	29
18.	Contato.....	30

1. Resumo e contextualização

A dermatofitose é uma infecção fúngica superficial comum que afeta entre 20 e 25% da população mundial. Nos últimos anos, houve um crescimento no número de casos com apresentações incomuns, atípicas e crônicas/recidivantes/recalcitrantes, resultando em um problema de saúde pública. Vários casos de onicomicose, *tinea pedis* e *tinea corporis*, causadas pelos fungos *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale*/*T. mentagrophytes*, resistentes à terbinafina foram relatados na Europa e na Ásia, com alta incidência na Índia. A terbinafina, um antifúngico alilamina usado por via oral e tópica, é considerada uma droga de primeira linha na terapia de infecções dermatófitas. A resistência à terbinafina tem sido predominantemente atribuída às mutações pontuais não sinônimas (Leu³⁹³, Phe³⁹⁷) no gene *SQLE*, que codifica a esqualeno mono-oxigenase. Atualmente, os testes laboratoriais de dermatofitose muitas vezes ainda são baseados em microscopia e cultura, técnicas que possuem sensibilidade limitada, mais propensas a erros. Além disso, testes de susceptibilidade antifúngica raramente são realizados.

O kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR (PN-303) é capaz de detectar mutações pontuais no gene *SQLE* que resultam na resistência à terbinafina e são diferenciadas de dermatófitos com *SQLE* do tipo selvagem. Além disso, o kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR detecta e diferencia as espécies dermatófitas *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) e *Trichophyton interdigitale* (*T. interdigitale*)/*Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*). Outras espécies de *Trichophyton*, incluindo *Trichophyton violaceum* (*T. violaceum*), *Trichophyton soudanense* (*T. soudanense*), *Trichophyton tonsurans* (*T. tonsurans*), *T. mentagrophytes* ITS tipo IV e *Trichophyton schoenleinii* (*T. schoenleinii*)/ *Trichophyton quinckeanum* (*T. quinckeanum*) também podem ser detectados, mas informações limitadas estão disponíveis sobre seus perfis de resistência à terbinafina.

O kit de Extração PathoNostics (PN-502) é recomendado para extração eficiente de DNA de amostras de unhas, cabelos e pele.

2. Utilização pretendida

O kit destina-se apenas para uso em pesquisa (RUO).

O produto destina-se a ser utilizado apenas por profissionais de laboratório.

3. Princípio do ensaio

O kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR (PN-303) foi concebido para a detecção de DNA fúngico em amostras de cultura, unhas, cabelos e pele e identifica mutações no gene *SQLE* e os dermatófitos *T. rubrum*/*T. soudanense*, *T. interdigitale*/*T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* ITS tipo IV e *T. schoenleinii*/*T. quinckeanum*. O kit é composto por uma mix pronta para uso que contém *primers* e sondas específicos para a detecção e identificação dessas espécies comuns de *Trichophyton* com mutações em *SQLE*. O kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR é baseado na tecnologia de PCR em tempo real, que é ativada por sondas

fluorescentes presentes nas mix. A detecção é realizada através da amplificação e análise da curva de *melting* equipamentos de PCR em tempo real, capazes de detectar fluorescência nos canais de detecção verde, amarelo, laranja e vermelho.

Um Controle Interno (CI) é incluído no kit para discriminar entre amostras negativas verdadeiras e falsas, que podem ser resultado de degradação de ácido nucleico, inibição de PCR ou falha no teste. Um controle positivo (CP) também é fornecido, que deve ser integrado em cada execução.

O material usado com o kit é o DNA extraído obtido de amostras de unhas, cabelos e pele ou material de cultura. A preparação das amostras e a extração de ácido nucleico são descritas na seção 10 desse manual.

4. Produtos e alvos

Uma visão geral do kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR e seus alvos correspondentes pode ser encontrada na tabela 1.

O kit de Extração PathoNostics (PN-502) está disponível para a extração de DNA de amostras de unhas, cabelos e pele. O kit Universal Colorcomp (PN-501) está disponível para usuários finais do LC480 II.

Tabela 1: Alvos do kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR

Kit DermaGenius® Resistance (PN-303)	
Patógeno	Alvo
Espécies de <i>Trichophyton</i>	<i>SQL</i>
<i>T. interdigitale/T. mentagrophytes</i>	<i>ITS</i>
<i>T. tonsurans</i>	<i>ITS</i>
<i>T. mentagrophytes</i> ITS tipo IV	<i>ITS</i>
<i>T. schoenleinii/T. quinckeanum</i>	<i>ITS</i>
<i>T. rubrum/T. soudanense</i>	<i>ITS</i>
<i>T. violaceum</i>	<i>ITS</i>
Controle Interno	<i>Fagos M13</i>

5. Materiais fornecidos

Componentes do kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR (PN-303)

Todos os materiais incluídos no kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR (PN-303) estão listados na tabela 2.

Tabela 2. Materiais fornecidos no kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR (PN-303).
O kit realiza 25 reações.

Componentes	Referência do componente	Volume (µl)	Cor da tampa de rosca
DG Master Mix	CNP2092A	>250	Azul
Taq polimerase	CNP2102A	>37,5	Roxo
Tampão de diluição	CNP0012B	>950	Transparente
Controle interno	CNP2043A	>500	Preto
Controle Positivo de Resistência DG	CNP2093A	>125	Azul
<i>DermaGenius® Resistance - Instruções de Uso</i>			
<i>Fichas de Dados de Segurança do Material (FISPQ)</i>			
<i>Certificado de análise</i>			

Kit de extração PathoNostics (PN-502)

O kit de extração PathoNostics (PN-502) pode ser encomendado em conjunto com o kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR (PN-303). O kit de extração PathoNostics é adequado para a extração de DNA de amostras de unhas, cabelos e pele (ver seção 10). Todos os materiais incluídos no kit de extração PathoNostics estão listados na tabela 3.

Tabela 3. Materiais fornecidos no kit de extração PathoNostics (PN-502).

O kit é adequado para 50 reações.

Componentes	Número do componente	Volume (µl)	Cor da tampa de rosca
Solução A	3x CNP2032B	3x > 1700	Azul
Solução B	1x CNP2033A	1x >700	Amarelo
<i>Fichas de Dados de Segurança do Material (FISPQ)</i>			
<i>Certificado de análise</i>			

Observação: O DNA obtido usando o kit de extração PathoNostics (PN-502) não pode ser usado para análise de sequenciamento pois não foi otimizado para esta aplicação.

6. Materiais necessários, mas não fornecidos

O kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR é adequado para instrumentos de PCR em tempo real que possuem no mínimo 4 canais de detecção fluorescentes diferentes (especificados na seção 11). O kit foi testado nos equipamentos LightCycler® 480 II (LC480 II; Roche), Rotor-Gene® Q (RGQ; QIAGEN), CFX96™ (Bio-Rad), QuantStudio 5 (QS5; Thermo Fisher Scientific) e Magnetic Induction Cyler (Mic qPCR cyler; BMS). Certifique-se de que os instrumentos de PCR em tempo real foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações e diretrizes de qualidade do fabricante.

Consumíveis

- Ponteiros descartáveis contendo filtros hidrofóbicos;
- Tubos estéreis de 1,5 ml livres de DNase;
- Tubos estéreis de 1,5 ml isentos de DNase com fechadura de segurança;

- Tubos de PCR de 0,1 ou 0,2 ml isentos de DNase (QIAGEN®, código de produto 981103 ou Thermo Scientific, código de produto AB-0620) para utilização de instrumentos RGQ;
- Placas de PCR Multiwell plate 96 (Roche, código de produto 04 729 692 001) para utilização em instrumentos LC480 II;
- Tubos e tampas livres de DNase Mic (BMS, ref 60653) para uso no ciclador Mic qPCR;
- Placas de PCR Hard-shell® de 96 poços, parede fina (Bio-Rad, Hsp9655) para uso no CFX96™;
- Placas de PCR MicroAmp Fast Optical 96-well 0,1 ml (Applied Biosystems, ref 4346906).

Equipamento

- Pipetas ajustáveis: 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl;
- Rack de tubos de 1,5 ml;
- Bloco de gelo ou estante gelada para tubos de 1,5 ml (para *Taq* polimerase)
- Bloco de resfriamento de PCR ou gelo para tubos de reação de PCR e placas de 96 poços;
- Misturador Vortex;
- Termoshaker ou bloco de aquecimento (aquecimento $\geq 98^{\circ}\text{C}$);
- Centrífuga de bancada com rotor para tubos de 2,0 ml;
-
- Cabine de fluxo laminar;
- Centrífuga adequada para placas de PCR (necessária para LC480, CFX96 e QS5);
- Equipamentos LightCycler® 480 II (Roche), Rotor-Gene® Q (QIAGEN), CFX96™ (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) ou Mic qPCR (Bio molecular systems).

Reagentes, consumíveis e equipamentos adicionais para extração de DNA de culturas

- Componentes de extração de DNA: Reagentes de extração de NucliSENS® easyMag®
- *Beads* apropriadas (recomendação: MagNA Lyser® Green Beads da Roche, código de produto 03 358 941 001)
- *Bead-beater* (recomendação: MagNA Lyser®, Roche)
- Kit de extração NucliSENS® easyMag®

7. Precauções gerais

A realização de atividades de laboratório deve ser sempre feita em conformidade com os regulamentos gerais de segurança. Para obter mais informações sobre produtos químicos, consulte as fichas de dados de segurança de materiais (FISPQ) apropriadas, que podem ser solicitadas.

As seguintes precauções devem ser tomadas para evitar a contaminação e permitir o desempenho e a reprodutibilidade ideais da PCR:

- Este ensaio molecular só deve ser realizado por pessoal de laboratório qualificado.
- Ao trabalhar com produtos químicos, use sempre um jaleco de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção.
- Separe fisicamente os locais de trabalho, conforme descrito na tabela 4.
- Use **ponteiras descartáveis** contendo filtros hidrofóbicos para evitar a contaminação cruzada.
- Use tubos de PCR livres de DNase.
- Mantenha **as enzimas** sempre no **gelo** ou em um **bloco de resfriamento** quando retiradas do freezer. Manuseie as enzimas com cuidado e misture muito suavemente.
- Quando descongelado, faça uma breve centrifugação **nos reagentes** por 5 segundos e misture suavemente pipetando para cima e para baixo.
- O programa de ciclagem deve ser programado no instrumento de PCR em tempo real antes de executar o ensaio ou pedir ao seu distribuidor local um arquivo de modelo de execução.
- Faça uma breve centrifugação na placa de PCR antes de transferir para o termociclador em tempo real (não necessário para RGQ e Mic).
- Não abra os tubos/placas de PCR após a amplificação.

8. Armazenamento e manuseamento de reagentes

Os componentes do kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR devem ser armazenados protegidos da luz entre -15 °C e -30 °C. A data de validade está indicada no rótulo do kit. O descongelamento e o congelamento repetidos devem ser evitados.

Os componentes do kit de extração PathoNostics (PN-502) devem ser protegidos da luz e armazenados em ambiente seco à temperatura ambiente (**+15 °C a +25°C**). O prazo de validade está indicado no rótulo da caixa externa.

Para evitar a contaminação, recomendamos realizar as atividades em três áreas separadas e armazenar os controles positivos em uma área separada (tabela 4).

Tabela 4. Procedimentos de manuseio em diferentes áreas

Localização	Manipulação
Área 1	Master mix, Taq polimerase, tampão de diluição Preparação da mix de amplificação
Área 2	Kit de controle positivo e controle interno, Extração de DNA Adição do DNA extraído à Master Mix Adição de controles positivos
Área 3	Reação de PCR em tempo real

9. Armazenamento e manuseamento de amostras

Os resultados do kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR dependem fortemente da qualidade e quantidade de amostra colhida como entrada para a extração de DNA. Uma série de recomendações para o manuseio e coleta ideais de amostras:

- Certifique-se de que as amostras são coletadas da parte infectada e/ou região da unha (figura 1), pele (figura 2) e cabelo (figura 3) para identificação do agente causador.
- A quantidade de material biológico necessário para cada tipo de amostra como entrada para a extração de DNA está listada na tabela 5 e nas figuras 1-3.
- Evite grandes partes das unhas e unhas com fragmentos de sangue (o que pode resultar na inibição da PCR).
- Observe que o manuseio de pelos (use pinças) pode ser difícil devido ao comportamento estático dos pelos em tubos de plástico. As amostras de cabelo com flocos de folículo/pele, que são suspeitos de infecção fúngica, devem ser selecionadas usando pinças antes de serem transferidas para o tubo de 1,5 ml.

Tabela 5. Material da amostra, tipo e quantidade necessários para a extração do DNA.

Amostra	Tipo de amostra	Quantidade de amostra para extração de DNA
Unha	Amostra retirada da parte infectada da unha	Use pequenas partes infectadas da unha (ver figura 1). Evite cortar a unha.
Pele	Escamas de pele de raspagens	Use escamas de pele (< 20 peças; veja a figura 2)
Cabelo	Cabelo com folículo ligado, comprimento máximo de 2 cm do couro cabeludo	Use uma quantidade limitada (<10 cabelos) de cabelos curtos (2 cm do couro cabeludo) com folículo/pele presa (ver figura 3)
Cultura	Micélio dermatófito em uma placa de ágar	Recolha material de cultura (~3 mm ²) com bisturi estéril ou alça de inoculação e evite transferir ágar para a extração de DNA.



Figura 1. Amostras de unhas. (A) Como obter as amostras, (B, C) quantidade de amostra de unha para a extração de DNA.

A

B

C



Figura 2. Amostras de pele. (A) Como obter amostras de pele, (B, C) quantidade de amostra de pele para a extração de DNA.



Figura 3. Amostras de cabelo. (A) Como obter amostras de cabelo, (B, C) quantidade de amostra de cabelo para a extração de DNA.

10. Extração de ácido nucleico

O kit de extração PathoNostics (PN-502) realiza o procedimento de extração de DNA e é recomendado para amostras de unhas, cabelos e pele. Este método garante um alto rendimento de DNA com tempo prático limitado. Além do kit de extração PathoNostics (PN-502), outros procedimentos de extração de DNA podem ser usados (por exemplo, NucliSENS easyMAG system) para extração de DNA de culturas.

10.1. Kit de Extração PathoNostics (PN-502) para amostras de unhas, cabelos e pele

O kit de Extração PathoNostics (PN-502) é projetado para extrair DNA de amostras de unhas, cabelos ou pele. Todos os materiais incluídos no kit de extração estão listados na tabela 3 e são adequados para 50 reações.

Recomendações gerais para a extração de DNA

- Realize a extração de DNA em uma cabine de segurança de fluxo de ar laminar descontaminado. Por favor, **tenha cuidado para NÃO ativar o fluxo de ar ao trabalhar com raspagens de unhas, pois isso pode espalhar o material facilmente pelo fluxo de ar do gabinete.** O fluxo de ar pode ser ativado novamente

quando as amostras forem cobertas com a solução A. É aconselhável descontaminar a cabine após o uso com uma solução de descontaminação (e acionando a luz UV por 30 minutos).

- Use o controle interno que está incluído no kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR como um controle para o procedimento de extração de DNA.
- Por favor, note que o DNA também pode ser degradado ao longo do tempo a -20° C e 4° C e, portanto, recomenda-se testar a amostra diretamente após a extração do DNA. Evite também o congelamento/descongelamento, pois isso pode resultar em degradação do DNA.
- Armazenar as amostras a 4°C quando utilizadas no mesmo dia, mas conservar a -20° C para um armazenamento mais longo.
- Não extraia DNA para mais de 16 amostras de uma só vez (caso contrário, o tempo total de extração por amostra será excedido).
- Não exceda a incubação de 10 minutos a 98° C.

Observação geral

- Durante a extração de DNA com a solução A e a neutralização com a solução B, pode-se observar um cheiro de enxofre. O componente contendo enxofre é o sulfeto de hidrogênio (H₂S), responsável pelo cheiro, mas inofensivo para a saúde humana porque a concentração está abaixo dos níveis detectáveis. Esta situação foi amplamente avaliada por estudos internos e externos.

Procedimento

1. Adicione uma amostra de unha/cabelo/pele em um tubo estéril de 1,5 ml com trava de segurança utilizando um par estéril de pinças (descontaminar entre as amostras com etanol a 70%);
2. Adicione 100 µl de solução A ao tubo de 1,5 ml que contém a amostra de unhas/pelos/pele;
3. Certifique-se de que a amostra está coberta pela solução A;
4. Adicione 5 µl de controle interno à solução A que contém a amostra de unha/cabelo/pele e misturar pipetando para cima e para baixo;
 - **NOTA:** Ao extrair mais amostras, uma pré-mistura de solução A e controle interno pode ser preparada.
5. Incube 10 minutos a 98°C em um bloco de aquecimento;
 - **NOTA: Não exceda o tempo de incubação de 10 minutos!**
6. Faça uma breve centrifugação para que as gotículas desçam até o fundo do tubo;
7. Adicione 14 µl de solução B à amostra incubada;
8. Leve a solução ao vórtex e após homogeneização da solução, centrifugue por 1 minuto a 13000 rpm;
9. Transfira o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml e guarde a 4° C se for testar no mesmo dia ou a -20 °C para período mais longos.
 - **NOTA:** Evite a transferência de partes sólidas das unhas/cabelos/pele (que podem estar presentes na parte inferior do tubo) para o novo frasco.

10.2. Extração de DNA para culturas

A extração de DNA de culturas de dermatófitos com o kit de extração PathoNostics **não** foi **extensivamente testada**. Caso o kit de extração PathoNostics seja usado, uma pequena quantidade da cultura é necessária, porque o rendimento de DNA é muito maior em comparação com amostras de unhas, cabelos ou pele. Note-se que nenhum ágar deve ser transferido para a solução A para evitar a inibição da PCR (ver quadro 5).

O procedimento recomendado para extração de DNA de culturas de dermatófitos inclui a aplicação de materiais e reagentes da bioMérieux para extração de DNA utilizando o NucliSENS® easyMag®. Recomenda-se realizar a extração e preparação de ácido nucleico em um gabinete de fluxo laminar. O procedimento de extração pode ser continuado em uma bancada de trabalho uma vez que a amostra é lisada. É aconselhável descontaminar o gabinete de fluxo laminar após o uso com uma solução de descontaminação apropriada e executar a luz UV por 30 minutos.

Recomendações gerais para a extração de DNA

- Realizar a extração e preparação de ácido nucleico, incluindo lise, em um gabinete de segurança de fluxo de ar laminar descontaminado. O procedimento de extração pode ser continuado em uma bancada de trabalho uma vez que a amostra é lisada. É aconselhável descontaminar o fluxo após o uso com uma solução de descontaminação (e acionando a luz UV por 30 minutos).
- Use o CI que está incluído no kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR como um controle para o procedimento de extração de DNA.
- Armazenar as amostras a +4°C quando utilizadas no mesmo dia, mas conservar a -20°C para períodos mais longos.

Procedimento

1. Adicione 500 µl de tampão de lise (do easyMag®) ao tubo verde de *beads*;
2. Adicione 10 µl de controle interno ao tampão de lise presente no tubo de *beads*;
3. Transfira uma colônia (sem ágar) para o tubo de *beads* e misture bem;
4. Encube por 10 minutos à temperatura ambiente;
5. Leve os tubos ao MagNA Lyser® (Roche) por 45 segundos a 6500 rpm;
6. Centrifugue por 1 minuto a 13000 rpm (velocidade máxima) para remover a espuma que é gerada durante o batimento das *beads* no MagNA Lyser;
7. Transfira 200 µl do sobrenadante contendo o DNA para a bandeja easyMag®;
 - Prepare o easyMag® de acordo com as instruções do fabricante;
 - Selecione 200 µl como volume de entrada e 100 µl como volume de eluição;
 - Selecione o protocolo genérico;
 - Selecione o protocolo de lise (o easyMag® dispensará o tampão de lise) e incube por 10 minutos;
 - Prepare a solução de *beads* de sílica magnética;
 - Após a lise, adicione as *beads* de sílica magnética preparadas ao tampão de lise e ressuspenda;
 - Inicie a extração de DNA no easyMag®;
 - Após 34-40 minutos, transfira o DNA eluído para tubos livres de Dnase.

10.3. Controle interno (CI)

O CI no kit é fornecido como uma solução de bacteriófago M13 e é usado para discriminar amostras realmente negativas de amostras falso-negativas que podem ser resultado de degradação de ácido nucleico, inibição de PCR ou falha no teste.

10.4. Controle positivo (CP)

O controle positivo (CP) no kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR consiste em fragmentos sintéticos de DNA e cobre regiões-alvo que são detectadas no ensaio. O CP deve ser manuseado como um extraídot normal de ácido nucleico e deverá ser usado como controle para o procedimento correto de PCR em tempo real. O procedimento de extração de DNA não é necessário para o CP.

11. Configurações do instrumento de PCR em tempo real

O kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR é testado nos instrumentos em tempo real RGQ, LC480 II, CFX96, QS5 e Mic qPCR cycler utilizando quatro canais de detecção diferentes. **Para todos os instrumentos em tempo real mencionados, um arquivo de modelo de protocolo PCR e um guia de instalação específico estão disponíveis. Isso pode ser solicitado a PathoNostics ou ao seu distribuidor local.**

Configurações de filtro

As configurações de filtro do RGQ, LC480 II e QS5 para detecção de fluorescência nos quatro canais estão listadas na tabela 6. Esses formatos de fonte/detector (também conhecidos como espectros de emissão/excitação) devem ser configurados no instrumento RGQ, LC480 II e QS5 e ajustados de acordo com as configurações da tabela 6. As indicações dos quatro diferentes canais de detecção do CFX96 e do Mic também são mostradas na tabela 6. A programação dos instrumentos deve ser efetuada de acordo com as instruções do fabricante. A detecção de sinal nos quatro canais deve ser ativada.

Tabela 6. Configurações de filtro para detecção ideal de sondas do kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR

Multiplex de resistência	Rotor-Gene (nm)		LC480 II (nm)		QuantStudio 5	CFX96	Mic qPCR
	Fonte	Detector	Fonte	Detector			
SQLE	470	510	465	510	FAM	FAM	Verde
<i>T. interdigital</i> / <i>T. mentagrophytes</i>	530	555	533	580	VIC	HEX	Amarelo
<i>T. rubrum</i>	585	610	533	610	ROX	ROX	Laranja
CI	625	660	618	660	CY5	CY5	Vermelho

Configurações de ganho (RGQ)

As configurações de ganho para um instrumento RGQ são selecionadas para evitar a saturação nos canais de detecção. Antes da execução RGQ, as configurações de ganho corretas devem ser determinadas. A função de otimização de ganho é recomendada tanto para amplificação quanto para *melting*.

1. Selecione a otimização de ganho no assistente de perfil do *software* Rotor-Gene;
2. Selecione 'executar otimização a 55 graus no início da execução';
3. Clique em 'otimizar aquisição', isso deve permitir a otimização de ganho para verde, amarelo, laranja e vermelho depois de gerar o protocolo correto de PCR de resistência DermaGenius®;
4. Selecione 'Posição do tubo', selecione os quatro canais e selecione 5 a 10 FI (intensidade de fluorescência mínima e máxima) e -10 a 10 para uma faixa de ganho aceitável (mínima e máxima). Use 10 a 15 FI para o canal verde. Um exemplo é fornecido na figura 4;
5. Além disso, selecione também a otimização de ganho durante o procedimento de *melting* e selecione 50 para o ganho "dando a maior fluorescência" (figura 5). Isso pode ser importante para evitar a saturação do sinal de *melting*.

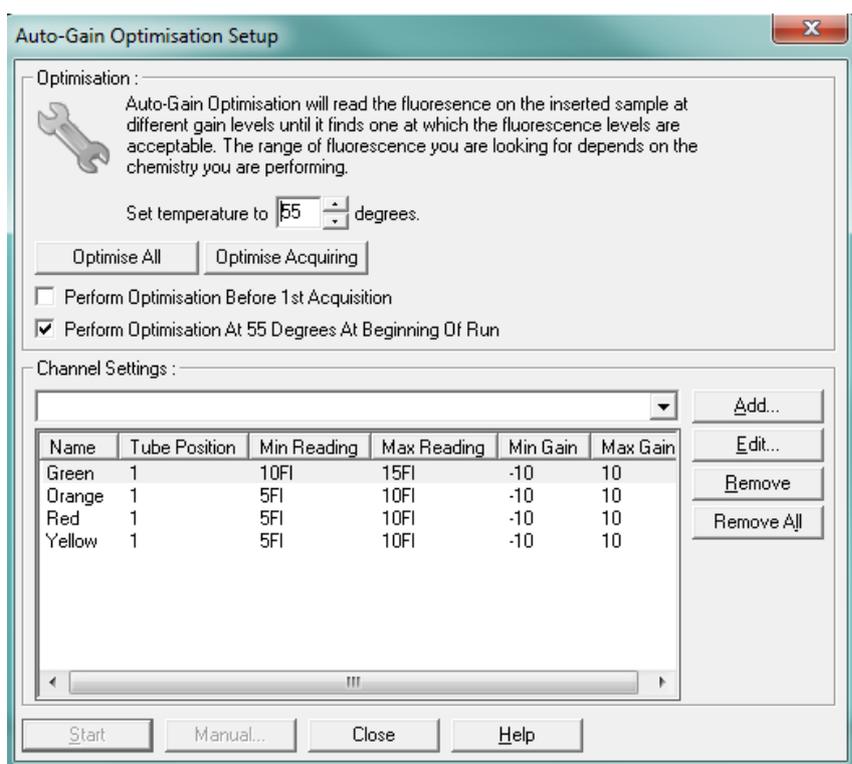


Figura 4. Configuração de otimização de ganho no *software* Rotor-Gene. Exemplo da tela de otimização de ganho durante a amplificação.

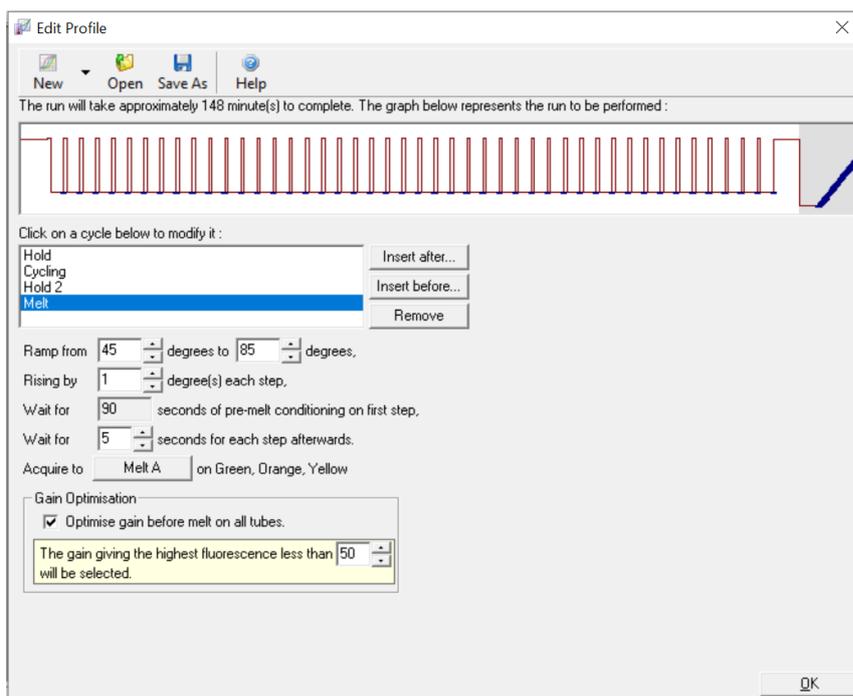


Figura 5. Exemplo para o melt no software Rotor-Gene. Selecione otimizar o ganho antes do *melt* em todos os tubos.

Compensação de cor (LC480 II)

Devido à sobreposição dos espectros de emissão dos diferentes corantes, pode ocorrer *cross-talk* entre os canais de detecção. No instrumento LC480 II, o *cross-talk* pode ser compensado usando um arquivo de compensação de cores. Esse arquivo de compensação de cor necessário pode ser gerado executando um experimento de compensação de cores com o kit Colorcomp, que é fornecido separadamente pela PathoNostics mediante solicitação (Universal Colorcomp; PN-501).

Selecione o tipo de placa correto (CFX 96)

Use os canais de detecção preparados pelo fabricante: FAM, HEX, ROX e Cy5. Esses canais de detecção são calibrados para placas transparentes e brancas. Selecione o tipo de placa correto (branco ou transparente) antes de executar uma PCR em tempo real.

Selecione as propriedades corretas (QS5)

Use as seguintes configurações na tela de propriedades do QuantStudio™ Design & Analysis Software:

- Curva Padrão Relativa como Tipo de Experimento;
- Reagente SYBR® Green como Química;
- Padrão como modo de execução.

Devido à sobreposição dos espectros de emissão dos diferentes corantes, pode ocorrer diafonia entre os canais de detecção. O QS5 requer uma calibração *Custom Dye* para o canal 470-520 nm, que pode ser gerado com o kit PathoNostics Color Calibration (PN-507).

Programa de PCR em tempo real

O protocolo de PCR em tempo real para o kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR (PN-303) inclui amplificação por 45 ciclos e subsequente análise de curva de *melting* para identificação de mutante *SQLE* ou tipo selvagem. O programa de PCR em tempo real está listado na tabela 7.

Tabela 7. Programa de PCR em tempo real.

Passo	Tempo	Temperatura	Função
<i>Desnaturação</i>	2 minutos	95°C	Ativação da Taq/ Desnaturação inicial
<i>Ciclagem (45x)</i>	15 segundos	96°C	Desnaturação Anelamento e extensão
	60 segundos	55°C *	
<i>Melting</i>	2 minutos	96°C	Desnaturação
	90 segundos **	45°C 45-85°C*	<i>Hold</i> <i>Melting</i>

*ativar a detecção fluorescente, conforme descrito na tabela 6.

** A *ramp-rate* depende do equipamento de PCR em tempo real, ver tabela 8.

Uma visão geral da duração do protocolo é mostrada na tabela 8. As especificações do *melting* também estão incluídas nesta tabela.

Tabela 8. Duração do programa de PCR em tempo real e observações para o procedimento de *melting*.

Instrumento de PCR em tempo real	Duração do programa de PCR (em min)	Observações sobre o <i>melting</i>
LC480 II	110	1 aquisição por °C
RGQ	150	1 °C/cada passo + 5 segundos para cada passo posterior
CFX96	130	incremento de 0,5°C para 0:01
MIC	130	0,3° C/seg
QS5	120	0,04° C/seg

12. Procedimento**Recomendações**

- Descongele o DNA molde (se congelado) e todos os reagentes e mantenha-os resfriados;
- Mantenha as enzimas sempre em um bloco de resfriamento ou no gelo;
- Prepare uma quantidade um pouco maior do que a necessária para compensar as perdas de pipetagem;

12.1. Área 1: preparação da Master Mix

As mix de PCR em tempo real são realizadas em um volume final de 25 µl. Prepare a Master Mix de acordo com a tabela 9:

Tabela 9. Master Mix do kit de PCR DermaGenius® Resistance Multiplex.

Componente	Volume/reação (µl)	Volume para 10 amostras (µl)
DG Master Mix	10	100
Taq polimerase*	1,5	15
Tampão de diluição	8,5	85
Total Volume	20	200

* Mantenha no gelo ou bloco de resfriamento.

Homogenize a Master Mix cuidadosamente e dispense 20 µl por amostra/controle em um tubo de PCR ou poço da placa. Mantenha os tubos ou placas de PCR no gelo ou em um bloco de resfriamento.

12.2. Área 2: Adicionando DNA às misturas de PCR

- Adicionar 5 µl de DNA da amostra extraída (contendo CI) a um tubo com a Master Mix dispensada.
 - Reações NTC: adicione 5 µl de água livre de nucleases a um tubo/poço da placa com mistura de PCR em tempo real.
 - Reações do CP: adicione 5 µl de CP a um tubo/poço da placa com Master Mix.
- Feche os tubos de PCR ou sele a placa de PCR em tempo real e centrifugue brevemente (apenas necessário para uma placa de PCR em tempo real). Tente evitar bolhas de ar na placa.

12.3. Área 3: Inicie o instrumento de PCR em tempo real

- Coloque os tubos de PCR ou a placa de PCR em tempo real no termociclador;
- Selecione o programa de ciclos de PCR em tempo real e iniciar. O programa de ciclos de PCR em tempo real é demonstrado na tabela 7.

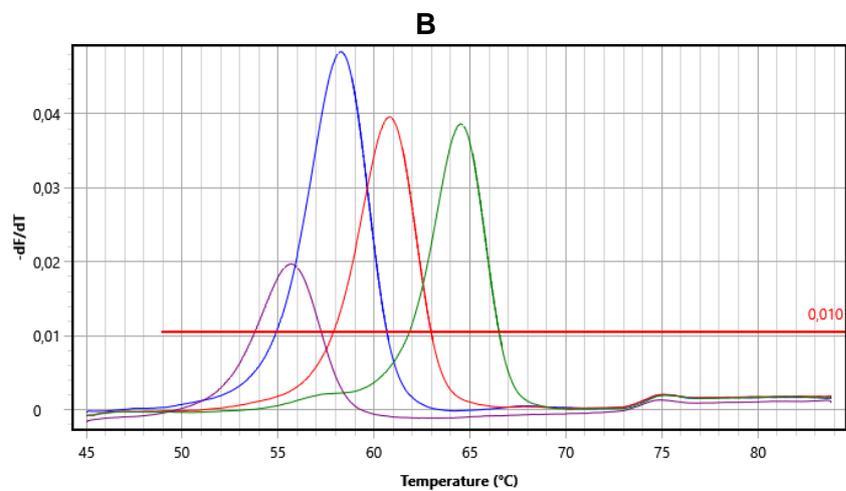
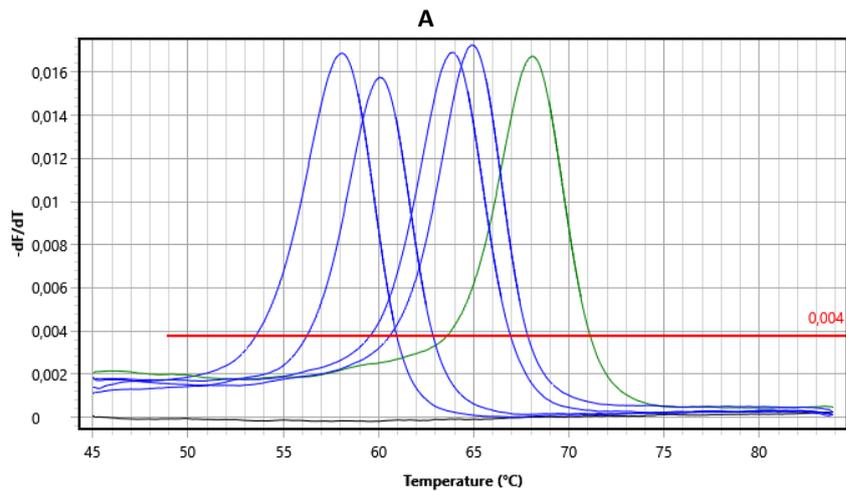
13. Análise de dados

Geral

As cepas *SQLE* de tipo selvagem resultam em um valor T_m mais alto do que as mutantes ($\geq 2^\circ\text{C}$ em comparação com a mutante com o maior T_m) e podem ser diferenciadas das cepas mutantes. Os picos de *melting* de todos os tipos de *SQLE* detectados com o kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR no Mic são ilustrados na figura 6A. Cada pico de *melting* representa uma mutação que resulta na mudança de aminoácidos na posição 393 ou 397 do gene *SQLE* (Phe397Leu, Leu393Phe,

Leu393Ser, Phe397Le ou Phe397Val), no entanto, a diferenciação real entre diferentes cepas mutantes não é possível.

A mistura de Resistência DG também pode detectar outros dermatófitos, além de *T. interdigitale*/*T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. No entanto, há informações limitadas ou inexistentes disponíveis se esses dermatófitos também tiverem mutações no gene *SQLE*. Os picos de *melting* dessas espécies de dermatófitos são mostrados nas figuras 6B e C.



C

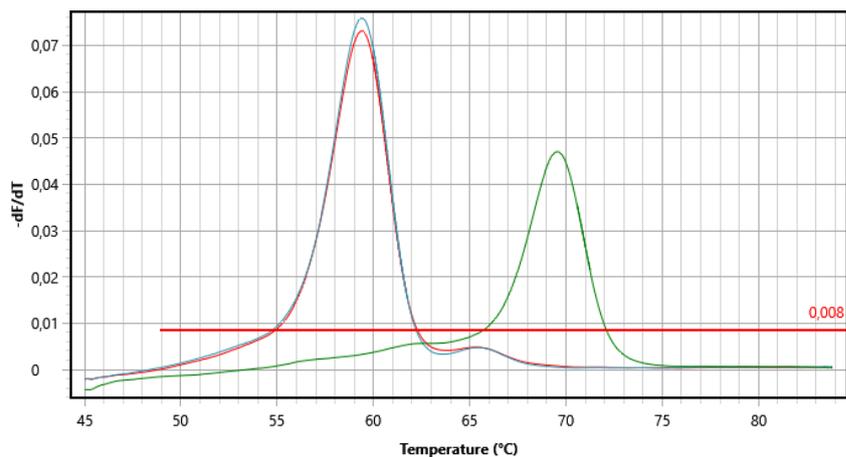


Figura 6. Picos de *melting* para todos os alvos detectados com o DermaGenius® Resistance Multiplex PCR. (A) *SQLE* selvagem (verde) e as várias mutações *SQLE* (azul) detectadas no canal de detecção verde. (B) *T. schoenleinii* (roxo), *T. interdigitale*/*T. mentagrophytes* (azul), *T. mentagrophytes* ITS tipo IV (vermelho) e *T. tonsurans* (verde) no canal de detecção amarelo. (C) *T. rubrum*/*T. soudanense* (vermelho/azul) e *T. violaceum* (verde) no canal de detecção laranja.

Threshold: Mic

Para determinar automaticamente os valores de Ct na qPCR, a função de *threshold* automático pode ser selecionada. Deve ser selecionado um *threshold* fixo em cada canal de detecção para a análise da curva de *melting*. Para obter as configurações de análise mais confiáveis no Mic qPCR, recomenda-se entrar em contato com a PathoNostics ou seu distribuidor local para obter um modelo de análise ideal.

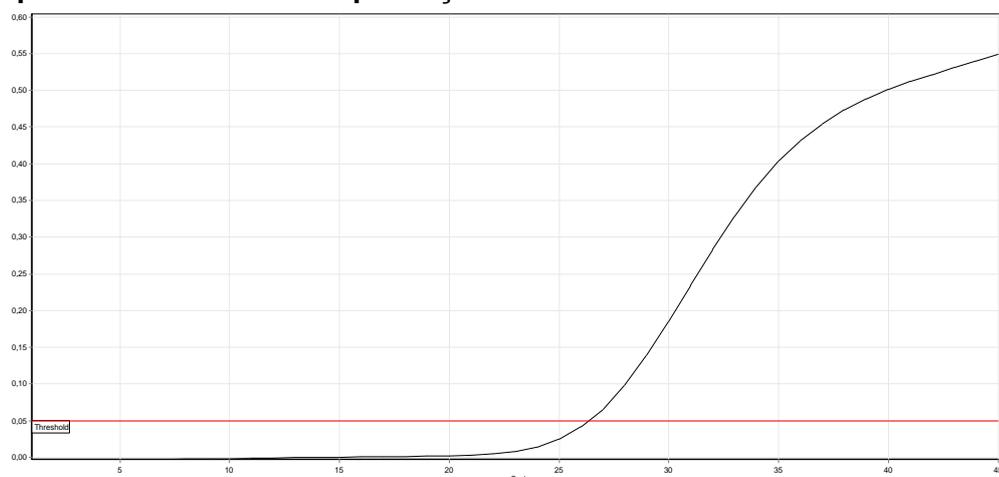
Threshold: RGQ

Antes de determinar o valor Ct com o *software* RGQ, verifique se o *baseline* está posicionado corretamente e ajuste, se necessário, usando a função correta de inclinação. Os *thresholds* recomendados para as curvas de amplificação estão listados na tabela 10. Por favor, note que esses valores são recomendados e baseados na intensidade máxima de fluorescência, mas podem variar entre amostras, execuções e diferentes instrumentos. Um exemplo de uma curva de amplificação obtida com o RGQ é ilustrado na figura 7.

Tabela 10. Threshold para curvas de amplificação no RGQ

Max FI (Fluorescência normalizada)	Threshold
< 0,2	0.025
0.2-0.6	0.05
0.6-1.0	0.1
>1,0	0.15

Como as intensidades de fluorescência podem variar entre diferentes instrumentos RGQ, nenhum valor de *threshold* é recomendado para a análise do pico de *melting*. Em geral, um pico de *melting* observado acima do sinal de fundo nas temperaturas de *melting* específicas (T_m) indica um sinal específico e pode ser indicado como positivo. O NTC pode ser usado como sinal de fundo. Os valores T_m específicos das sondas estão listados na tabela 12.

Exemplo de uma curva de amplificação**Figura 7. Curva de amplificação.** Exemplo de uma curva de amplificação de *T. interdigitale* no canal de detecção amarelo no RGQ.

Threshold: LC480 II

Para determinar os valores de Ct com o *software* LC480 II, recomendamos o uso da 2ª função derivada. Esta função determina automaticamente o valor Ct. No entanto, note que, com a 2ª função derivada, as amostras poderiam ser falsamente indicadas como positivas. Portanto, sempre verifique se uma curva de amplificação normal está presente e ajuste se necessário. Além disso, todas as curvas de amplificação com valores Ct > 40 são chamadas de 40 com a 2ª função derivada.

Não é possível introduzir um *threshold* horizontal para os picos de *melting*. Os valores de Tm dos picos de *melting* são automaticamente determinados pela função *Tm-calling* do *software* LC480.

Sempre verifique se um pico de *melting* específico está presente, comparando-o com o NTC, que é uma referência. Se necessário, use o método Tm manual, pois essa função permite uma identificação Tm mais precisa (figura 8). Para este propósito, selecione a caixa de espessura do método Tm manual abaixo dos gráficos e ajuste o *threshold* vertical manual para identificar a Tm correta.

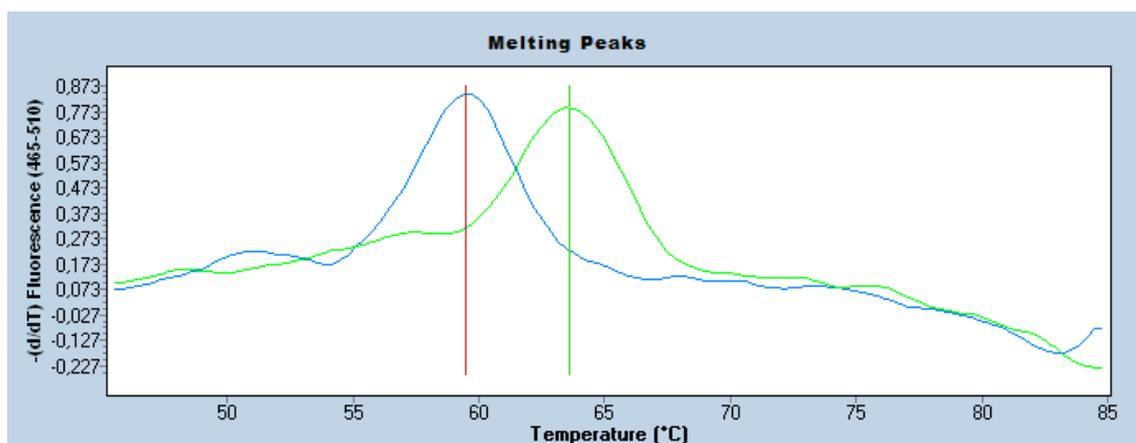


Figura 8. Seleção manual Tm no *software* LC480. Selecione Tm 1 e/ou Tm 2 para selecionar manualmente um *threshold* vertical para uma identificação mais exata de Tm.

Threshold: CFX96

Para determinar os valores de Ct com o *software* CFX, recomenda-se usar o modo de determinação de Cq e selecionar regressão. Esta função determina automaticamente o valor Ct. A opção *threshold* único pode ser selecionada para a seleção de um *threshold* manual, mas não é recomendada, pois não é padronizada. **Observe que os valores de Ct obtidos com o modo de regressão são menores do que quando um *threshold* manual é usado.**

Os valores Tm são fornecidos automaticamente ao usar um *threshold* para os picos de *melting*. Em geral, um pico de *melting* observado acima do sinal de fundo nas temperaturas de *melting* específicas (Tm) indica um sinal específico e pode ser indicado como positivo. O NTC pode ser usado como sinal de fundo. Os valores Tm específicos dos objetivos são enumerados no quadro 12.

Threshold: QS5

Os valores de Ct são determinados por um *threshold* automatizado. Isso pode ser ajustado no menu de configurações para manual, mas isso não é recomendado, pois não é padronizado.

14. Interpretação dos resultados

14.1. Interpretação dos dados do kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR

A interpretação dos dados do DermaGenius® Resistance Multiplex PCR é mostrada na tabela 11 (amplificação). Se nenhum sinal de amplificação em qualquer canal de detecção for observado ao usar o kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR, a amostra foi inibida, uma das etapas do ensaio no procedimento falhou ou ocorreu um erro manual. Consulte a seção 15 "solução de problemas" para saber como proceder.

Tabela 11. Interpretação dos sinais de amplificação de amostras de unha/cabelo/pele utilizando a mistura DG Resistance do kit de PCR multiplex DermaGenius® Resistance.

Equipamento	Amplificação DermaGenius® Resistance				Resultado
LC480	465-510	533-580	533-610	618-660	
RGQ	verde	amarelo	laranja	vermelho	
CFX	FAM	HEX/VIC	ROX	Cy5	
MIC	verde	amarelo	laranja	vermelho	
QS5	FAM	VIC	ROX	CY5	
	+/-*	+	-	+	<i>T. interdigitale</i> / <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>T. mentagrophytes</i> ITS tipo IV, <i>T. schoenleinii</i> / <i>T. quinckeanum</i>
	+/-*	-	+	+	<i>T. rubrum</i> / <i>T. soudanense</i> , <i>T. violaceum</i>
	-	-	-	+	Nenhuma espécie de <i>Trichophyton</i> , CI Positivo
	+/-	+/-	+/-	-	CI inibido pela alta carga de DNA, resultado ainda é válido
	-	-	-	-	Inválido

*SQLE pode ser negativo caso haja pouco DNA do dermatófito (Ct ≥ 30), ver também seção 15.

A análise da curva de *melting* é necessária para identificar espécies mutantes ou selvagens para SQLE (canal de detecção verde) e confirmar quais espécies de *Trichophyton* estão presentes (canal de detecção amarelo e laranja). As temperaturas de *melting* específicas (valores de Tm) são enumeradas no quadro 12. Note que as gamas específicas de Tm podem variar entre execuções e máquinas diferentes. **Sempre compare os valores de Tm obtidos com o CP.**

Tabela 12. Valores de Tm usando a Master Mix de resistência DG do kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR. Os valores de Tm são obtidos após a extração com o kit PathoNostics

Valores de Tm para DermaGenius® Resistance (°C)						
Canal	Alvo	RGQ	LC480	CFX96	MIC	QS5
Verde 465-510 FAM	SQLE Selvagem	66,5 – 69,0	66,0 – 69,0	65,0 – 68,0	66,5 – 69,5	64,5 - 68,0
	SQLE Mutante	56,0 – 66,0	56,0 – 65,5	54,0 – 64,0	58,5 - 66,5	54,0 – 64,0
Amarelo 533-580 HEX/VIC	<i>T. interdigitale/T. mentagrophytes</i> *	58,5 – 61,0	58,0 – 61,0	57,0 – 60,0	59,0 – 61,5	57,0 - 59,5
	<i>T. tonsurans</i>	65,0 – 68,0	64,5 – 67,5	64,0 – 67,0	65,0 – 68,0	63,0 – 66,0
	<i>T. mentagrophytes</i> ITS tipo IV*	61,0 – 64,0	61,0 – 64,0	60,0 – 63,0	61,5 – 64,5	59,5 – 62,0
	<i>T. schoenleinii/T. quinckeanum</i>	55,5 – 58,5	55,5 – 58,0	54,0 – 56,5	56,5 – 59,0	54,0 – 57,0
Laranja 533-610 ROX	<i>T. rubrum / T. soudanense</i>	57,5 – 60,5	57,5 – 60,5	56,0 - 59,0	58,0 - 61, 0	56,0 – 59,0
	<i>T. violaceum</i>	68,0 – 71,0	68,0 – 71,0	66,5 - 69,5	68,0 - 71, 5	66,5 - 69,5
Vermelho 618-660 Cy5	Controle Interno	Sem pico de <i>melting</i>				

*ver seção 15 para mais informações sobre a diferenciação de *T. interdigitale / T. mentagrophytes*

14.2. Controles

Todos os controles devem ser avaliados antes da análise dos dados das amostras para garantir a confiabilidade dos resultados antes da sua interpretação. Para verificar se existe um procedimento correto de extração de DNA (CI) e de PCR (CI e CP), os valores de Ct para todos os controles devem situar-se no intervalo aceitável (quadro 13). O valor de Ct para o CI depende fortemente da matriz da amostra, do procedimento de extração de DNA e da presença de múltiplos patógenos. No entanto, um sinal positivo para o CI deve ser detectado em amostras negativas, mas os valores de Ct podem ser variáveis.

Quadro 13: Valores de Cte Tm dos controles. Os valores de Ct são determinados usando as configurações de *threshold* recomendadas descritas neste manual. Por favor, note que os valores Tm do Controle Positivo podem ser ligeiramente mais baixos (-1,0° C) do que os das amostras, uma vez que se trata de DNA sintético e de DNA genômico obtidos após extração de DNA com o kit de Extração PathoNostics.

Controle	Alvo	Canal	Valor de Ct	Valor de Tm (°C)				
				RGQ	LC480 II	CFX96	MIC	QS5
CP 1	O SQLE	Verde 465-510 FAM	25 - 29	65,5 – 68,5	65,5 – 68,5	64,5 – 67,5	66,5 – 69,5	64,5 – 67,5
	T. <i>interdigital</i>	Amarelo 533-580 HEX/VIC	25 - 29	57,5 - 60,5	57,5 – 60,5	55,5 – 58,5	58,5 – 61,5	55,5 – 58,5
	T. <i>rubrum</i>	Laranja 533-610 ROX	26 - 30	57,0 – 60,0	57,5 – 60,5	55,5 – 58,5	58,5 – 61,5	55,5 – 58,5
	CI	Vermelho 618-660 Cy5	25 - 29	Sem pico de <i>melting</i>				
CI	Fagos M13	Vermelho 618-660 Cy5	30 - 36	Sem pico de <i>melting</i>				

15. Solucionando problemas

Esta seção de resolução de problemas pode ser útil para resolver quaisquer problemas que possam surgir (quadro 14).

Tabela 14. Solução de problemas de resultados obtido com o kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR.

Problema	Possível causa	Recomendações
O controle positivo não amplificou.	Um dos componentes não foi adicionado. O controle não foi armazenado corretamente. Perfil / programação de PCR incorreta.	Certifique-se de que todos os componentes foram adicionados. Verifique as condições de armazenamento e a data de validade do kit (indicada na etiqueta da caixa). Verifique a programação do termociclador em tempo real. Confira todas as etapas realizadas no esquema de procedimento/pipetagem e verifique a calibração da máquina de PCR em tempo real e pipetas.

<p>CI permanece negativo em amostras negativas.</p>	<p>Degradação do ácido nucleico ou inibição da reação de PCR.</p> <p>Mistura incorreta de PCR.</p> <p>As condições de PCR não estão em conformidade com o protocolo.</p> <p>CI insuficiente ou não foi adicionado.</p> <p>Utiliza-se um procedimento de extração de DNA que não é testado e resulta num rendimento de extração de CI menos eficiente.</p>	<p>Repita a extração de acordo com o protocolo.</p> <p>Verifique se são adicionadas <i>Taq</i> polimerase, mistura de PCR e amostra suficientes.</p> <p>Verifique as condições de PCR e repita a PCR com as configurações corretas, se necessário.</p> <p>Repetir a extração e preparar uma mistura de solução A com CI e, subsequentemente, dispensar 105 µl por amostra.</p> <p>Entre em contato com a PathoNostics para obter experiência com a plataforma de extração de DNA específica. Pode-se recomendar repetir a extração com mais CI, dependendo do procedimento de extração de DNA.</p>
<p>Controle Negativo gera um sinal de fluorescência.</p>	<p>Transferência / contaminação.</p>	<p>Repita o experimento de PCR em tempo real com reagentes frescos, manipule amostras, componentes do kit e consumíveis conforme prescrito e homogenize os reagentes antes da pipetagem.</p> <p>Se o problema ainda ocorrer, repita também a extração de DNA.</p> <p>Certifique-se de executar todas as etapas antes da extração de DNA em uma cabine de segurança de fluxo de ar laminar ou estação de trabalho de gabinete UV para evitar contaminação.</p> <p>Adicione controles positivos estritamente na última etapa.</p> <p>Certifique-se de que os espaços e instrumentos de trabalho são descontaminados regularmente.</p>
<p>Sinais de fluorescência muito fracos também para controles.</p>	<p>Configurações incorretas do instrumento.</p> <p>Combinação incorreta de PCR em tempo real.</p>	<p>Verifique as configurações de temperatura de desnaturação e canal/ganho.</p> <p>Verifique se a Master Mix está preparada de acordo com o protocolo.</p>

		Verificar a data de validade e as condições de armazenamento.
Curvas de amplificação inesperadas e/ou picos de melting para o CP.	Configurações incorretas do instrumento.	Usar colorcomp (LC480).
Curvas de amplificação sem picos de <i>melting</i>	Para alta concentração (Ct < 15). Concorrência com o CI. Configurações incorretas do instrumento (QS5).	Cultura de dermatófitos diluídos (100-1000x). Realize um <i>re-melt</i> . Se o problema ainda ocorrer, repita o procedimento de extração de DNA desta amostra em particular. Selecione "Curva Padrão Relativa" para o tipo de experimento e "Reagentes verdes SYBR®" para Química.

Problemas na análise de dados que podem surgir

T. mentagrophytes/T.interdigitale

A taxonomia de dermatófitos foi revisada em 2017 com base em técnicas moleculares e vários neotipos e cepas de referência foram atribuídos (De Hoog et al., Mycopathologia, 2017 Feb;182(1-2):5-31). No entanto, a diferenciação de espécies com base na identificação molecular nem sempre coincide com os conceitos existentes que são guiados por vários princípios. A partir desta nova revisão, a identificação de *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* estão em discussão, levando em conta a grande variação e o aparecimento dos sintomas e a origem da infecção. Com base na análise do gene ITS, uma classificação mais rigorosa foi feita, com *T. interdigitale* ITS tipo I e *T. interdigitale* ITS tipo II sendo considerados como dermatófitos antropofílicos distintos que quase exclusivamente causam *Tinea Pedis* e *Tinea onychomycosis*. Portanto, os sinais de *T. interdigitale/T. mentagrophytes* obtidos com o kit DermaGenius® Resistance após a extração de DNA podem ser considerados verdadeiras infecções por *T. interdigitale*. *T. mentagrophytes* é considerado um dermatófito zoófilo, com transmissão geralmente sendo através de vários roedores, mas também de outros animais e, portanto, não está predominantemente associado a um hospedeiro específico (Kupsch et al., J Dtsch Dermatol Ges, 2019 de maio; 17(5): 493-501). As infecções causadas por *T. mentagrophytes* ocorrem em todo o corpo, com exceção dos pés, e são mais prolongadas/graves do que as infecções por *T. interdigitale*. Os vários genótipos de *T. mentagrophytes* parecem estar associados a áreas geográficas específicas e manifestações fenotípicas (Taghipour et al., Mycoses, 2019 Nov; 62 (11): 1084-1091). Existem 8 genótipos diferentes de *T. mentagrophytes* atualmente identificados com base em dados de sequência ITS, dos quais 3 tipos são prevalentes na Europa. Destas

cepas europeias, a *T. mentagrophytes* Alemanha tipo 2 (ITS tipo IV) é detectada separadamente com o DermaGenius® Resistance Multiplex PCR.

Resultados recentes mostraram que essa classificação estrita é discutível. Por exemplo, *T. mentagrophytes* Tailândia (ITS tipo VII) é classificado de acordo com a taxonomia como um dermatófito zoófilo que, no entanto, só ocorre como uma infecção sexualmente transmissível, que é uma transmissão antropofílica (Kupsch et al., J Dtsch Dermatol Ges, 2019 maio; 17(5): 493-501). O mesmo se aplica a *T. mentagrophytes* Índia (ITS tipo VIII), onde ainda não há evidências de transmissão zoofílica, o que sugere que é de origem antropofílica. As várias fontes animais (não necessariamente animais de estimação) e, possivelmente, também fontes humanas tornam a diferenciação de *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale* não essencial. Além disso, a classificação atual de *T. interdigitale/T. mentagrophytes* baseada na genotipagem parece não ser mais sustentável e é confusa. As evoluções V são baseadas apenas em um único gene e análises moleculares futuras usando uma abordagem *multilocus* precisam estabelecer a validade das variantes de *T. interdigitale/T. mentagrophytes* (Singh et al., Fungal Genet Biol, 2019 Sep 3; 133 e Chowdhary et al., Mycoses, 2019 Ja; 62 (1): 11-15)). Portanto, os sinais de *T. interdigitale/T. mentagrophytes* obtidos com o kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR após extração de DNA da pele devem ser considerados como infecções por *T. interdigitale/T. mentagrophytes*.

Diferença de valor de Tm para controle positivo e DNA obtido com diferentes métodos de extração

Os valores de Tm podem diferir ligeiramente entre o CP (DNA sintético) e o alvo de DNA genômico obtido com o kit de extração PathoNostics como resultado de diferentes concentrações. Essa diferença é observada principalmente para a região-alvo de *T. interdigitale* no CP. O Tm é ligeiramente menor em comparação com o DNA genômico de *T. interdigitale* e, como resultado, esse pico de *melting* de CP é observado entre o pico de *melting* de *T. schoenleinii/T. quinckeanum* e o pico de *T. interdigitale/T. mentagrophytes*. Esse efeito foi observado em todos os instrumentos de PCR, exceto no instrumento Mic.

As diferenças de Tm também podem ocorrer como resultado de diferentes metodologias de extração de DNA. O kit de extração PathoNostics não inclui etapas de lavagem e purificação de DNA, o que pode resultar em valores de Tm mais altos. As diferenças de Tm foram, no entanto, limitadas tanto para *SQLE* quanto para ITS (< 1° C) e provavelmente não influenciarão a análise dos dados. No entanto, outros procedimentos de extração de DNA utilizados para culturas ainda podem resultar em maiores diferenças de Tm em comparação com extraídos obtidos com o PathoNostics Extraction Kit.

Nenhuma diferenciação de tipos mutantes *SQLE*

O alvo *SQLE* pode ser usado para diferenciar o tipo selvagem das cepas mutantes, mas a diferenciação entre os vários tipos mutantes é muito difícil, pois os valores Tm dos diferentes mutantes estão em um intervalo limitado.

A mutação Leu393Ser resulta no maior valor de T_m e está próximo do tipo selvagem com uma diferença de T_m de 2,0 – 3,0° C, dependendo do *software* de PCR e das definições utilizadas (ver também figura 6A). A diferença é, no entanto, suficiente para a diferenciação e esta mutação não é comum em comparação com as outras possíveis mutações no gene *SQLE*.

Diferença de Ct entre o alvo *SQLE* e os alvos ITS

A detecção de espécies de dermatófitos é possibilitada por sondas específicas para o ITS, o que resulta em alta sensibilidade. A identificação de uma possível resistência à terbinafina baseia-se na detecção de mutações no gene *SQLE* de cópia única. Como resultado, os valores de Ct obtidos para o alvo *SQLE* (no canal de detecção verde) são sempre superiores aos valores de Ct obtidos com os alvos das espécies de dermatófitos (no canal de detecção amarelo e laranja). Portanto, o *SQLE* pode ser negativo quando os valores de Ct para os alvos das espécies de dermatófitos são altos ($Ct \geq 30$), indicando uma concentração limitada de DNA do dermatófito. Observe que esse valor de Ct pode variar ligeiramente dependendo do *software* do instrumento de PCR e se um *threshold* automatizado ou manual está selecionado.

Picos de *melting* de *SQLE* mutantes para *T. schoenleinii* e *E. floccosum*

Os picos de *melting* de *SQLE* não selvagens nem sempre são específicos para mutações, dependendo da espécie *Trichophyton*. Para *T. schoenleinii*, o pico de *melting* de *SQLE* é sempre observado a um baixo valor de T_m (57 - 58° C), que é normalmente específico para cepas *SQLE* mutantes. No entanto, *T. schoenleinii* difere na sequência da região-alvo de *SQLE* em comparação com outras espécies de *Trichophyton*. Esta sequência diferente não codifica aminoácidos diferentes e, portanto, não reflete a resistência à terbinafina.

Esta sequência diferente na região-alvo de *SQLE* também pode ocorrer em outras espécies de dermatófitos, mas agora só é observada para *T. schoenleinii* e *E. floccosum*. Para *E. floccosum*, o valor da T_m do *SQLE* também é baixo (53 - 54° C), mas os alvos do ITS permanecerão negativos, pois não se destinam a detectar *E. floccosum*.

Cepas resistentes à terbinafina com *SQLE* tipo selvagem

É possível que as cepas de dermatófitos tenham um perfil elevado de resistência à terbinafina na presença de um pico de *melting* com *SQLE* do tipo selvagem. Além das mutações no *SQLE*, outros mecanismos ou mutações no gene *SQLE* em outros locais provavelmente também estão envolvidos na resistência à terbinafina, mas estes ainda não estão suficientemente investigados.

Formação de picos de *melting* sobressalentes para *SQLE* no RGQ

Os picos *SQLE* podem ser observados no RGQ como resultado da taxa de rampa limitada durante o procedimento de *melting*. Este efeito é mais pronunciado ao usar o rotor 36 em comparação com o rotor 72. Portanto, recomenda-se testar amostras no RGQ com o rotor 72.

16. Aviso ao Comprador

O kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR e o kit PathoNostics Extraction são fabricados pela PathoNostics B.V., Maastricht, Holanda, dentro de sistemas de qualidade acreditados pela ISO 13485:2016. Este produto é vendido para uso apenas pelo usuário final e só pode ser revendido, distribuído ou reembalado com a aprovação da PathoNostics e somente por distribuidores licenciados.

Reagentes de diferentes lotes de do kit DermaGenius® Resistance Multiplex PCR e PathoNostics Extraction não devem ser combinados.

Se um kit de PCR DermaGenius® Resistance Multiplex e o kit de extração PathoNostics forem recebidos em embalagens danificadas, entre em contato com a PathoNostics ou com o distribuidor local da PathoNostics.

17. Símbolos



<N>Contém reagentes suficientes para reações de <N>



Uso por



Número de catálogo



Número de lote



Limitação de temperatura



Fabricante



Consulte as instruções de uso



Manter afastado da luz

18. Contato

Para assistência técnica e mais informações, entre em contato conosco enviando um e-mail para info@pathonostics.com ou ligue para +31-43-3030423. Para obter assistência técnica, consulte o número de catálogo PN-3 03, PN-501 ou PN-502.

Fabricante:

PathoNostics B.V. Randwycksingel 45 6229 EG Maastricht

Telefone: +31 (0)43 3030423

Fax: +31(0)84 7469245

E-mail: info@pathonostics.com

Site www.pathonostics.eu

IMPORTADO E DISTRIBUÍDO POR:

Mobius Life Science Indústria e Comércio de Produtos para Laboratórios Ltda.

Rua Jandaia do Sul 441 – Pinhais – PR - CEP: 83.324-440

Telefone: (41) 3401-1850 | 0800-7101850

E-mail: suporte@mobiushlife.com.br | Website: www.mobiushlife.com.br

CNPJ: 04.645.160/0001-49

REGISTRO ANVISA

Não passível de registro.

Marcas: QIAGEN®, LightCycler® 480, Roche®, bioMérieux®, NucliSENS® easyMag®, Bio-Rad®, ThermoFisher Scientific™, Bio Molecular Systems, PathoNostics®, DermaGenius®.

Nota: Este documento é referente à revisão 01 da Mobius Life Science.

PathoNostics®