



Mentype[®] MycoDerm^{QS}

Bio **type**[®]
Diagnostic GmbH

Lateral Flow

Gebrauchsanweisung

Modulare Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) zum schnellen und zuverlässigen Erregernachweis bei Verdacht auf Dermatomykosen



50



MDLFGAv8de

1. März 2019

45-17611-0050

45-17612-0050



45-17613-0050

45-17615-0050



Biotype Diagnostic GmbH

Moritzburger Weg 67

D-01109 Dresden

Germany

Made in Germany

MDLFGAv8de

Die Biotype Diagnostic GmbH entwickelt, produziert und vertreibt PCR-basierte Anwendungen für die medizinische Diagnostik.

Unsere Mentype® Test Kits garantieren höchste Qualitätsstandards für Klinik und Forschung.

Für Informationen und Anregungen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.
Kontaktieren Sie uns oder besuchen Sie unsere Website www.biotype.de

Warenzeichen und Patente

Mentype® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Biotype Diagnostic GmbH.

Mastercycler® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Eppendorf AG.

QIAamp® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Qiagen GmbH.

Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die in diesem Handbuch verwendeten Markennamen oder Warenzeichen ungeschützt sind, auch wenn sie nicht als Markenname oder Warenzeichen gekennzeichnet sind.

© Biotype Diagnostic GmbH, alle Rechte vorbehalten.

Inhaltsverzeichnis

1. Beschreibung des Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow	5
2. Übersicht der notwendigen Arbeitsschritte	10
3. Weitere Reagentien und benötigte Ausrüstung	11
4. Wichtige Hinweise vor Präparationsbeginn	12
5. Protokolle zur DNA-Isolierung	13
5.1 Lyse der Patientenproben mit anschließender DNA-Isolierung unter Verwendung von DNA-freien 1,5 ml Standardzentrifugenröhrchen	13
5.2 PCR-Amplifikation	16
5.3 Lateral Flow	18
5.4 Auswertung.....	20
6. Alternativ-Protokolle für die Lyse der Patientenproben mit anschließender DNA-Isolierung	22
6.1 Lyse der Patientenproben mit anschließender DNA-Isolierung unter Verwendung von Sampletype i-sep® SQ	22
7. Problembehandlung	25
7.1 PCR-Amplifikation	25
7.2 Hinweise zur Probennahme und Probenlyse	29
8. Referenzen	31
9. Symbole	32
A Analytische Validierung	33
A a) Prüfmittel	33
A b) Testung der analytischen Spezifität	33
A c) Testung der analytischen Sensitivität	34
A d) Testung verschiedener DNA-Mischproben (Matrixeffekte)	34
A e) Testung des Einflusses verschiedener Annealingtemperaturen in der PCR	35
A f) Testung der Kurzzeitstabilität	36
B Leistungsbewertungsprüfung gemäß § 24 MPG (Medizinproduktgesetz)	36
B a) Rahmenbedingungen	36
B b) Methodik	36
B b) a) Probennahme und Versand	36
B b) b) Nativpräparate	37
B b) c) Pilzkultur	37
B b) d) DNA-Extraktion und Aufreinigung	38
B b) e) PCR	38
B c) Ergebnisse und Diskussion	38
B d) Referenzen	40

1. Beschreibung des Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow

Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow ist ein molekularbiologisches Nachweisverfahren zur effektiven Diagnostik von Dermatomykosen anhand von Haut-, Haarwurzel- und Nagelproben im medizinischen Routinelabor. Es basiert auf der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen, die in sogenannten Markergenbereichen der jeweiligen Dermatomykoseerreger liegen und eine artspezifische Unterscheidung zulassen.

Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow besteht aus drei Modulen. Dabei handelt es sich um drei unterschiedliche Multiplex-PCR Ansätze die, je nach Bedarf, verwendet bzw. kombiniert werden. Der abschließende, durch Richtlinien (Rili-BÄK, MiQ) geforderte, spezifische DNA-Nachweis erfolgt auf universellen Lateral-Flow Teststreifen.

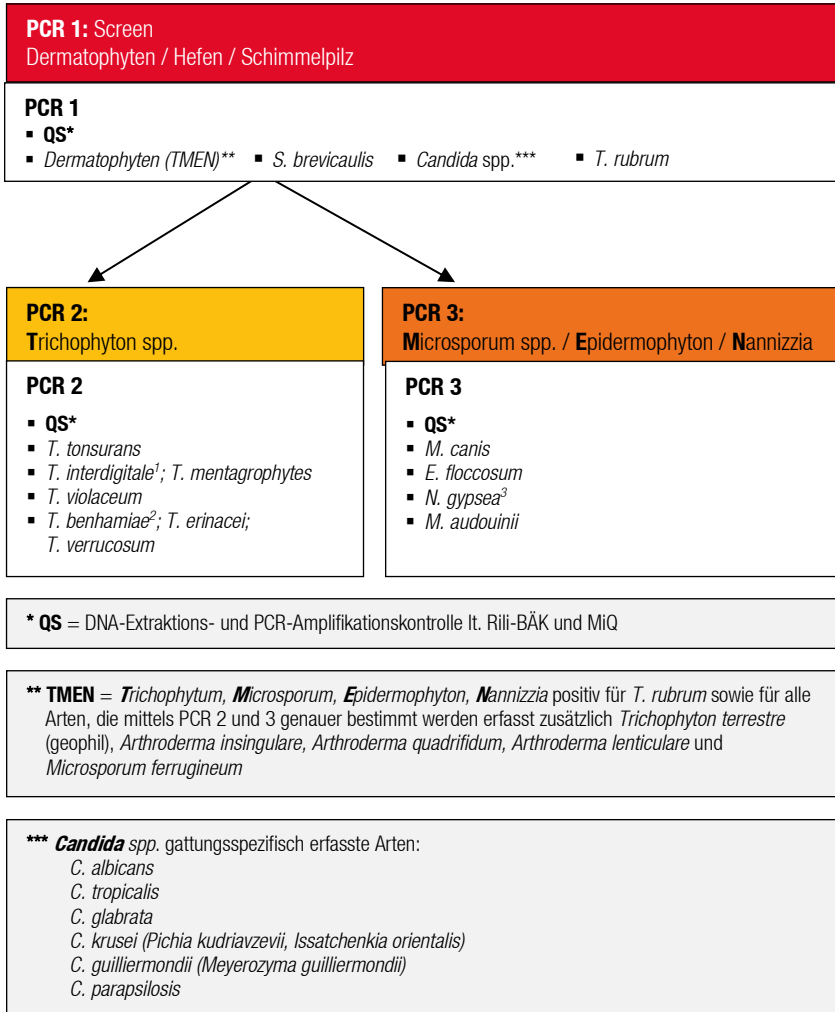
- Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow PCR 1
Nachweis von Dermatophyten (Gruppe), Hefen (Gruppe), *T. rubrum* und *Scopulariopsis brevicaulis*
- Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow PCR 2
Nachweis der Dermatophyten *T. tonsurans* und *T. violaceum*.
Als Cluster detektiert werden *T. verrucosum* und *T. benhamiae*/ *T. erinacei* sowie *T. interdigitale* und *T. mentagrophytes*.
- Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow PCR 3
Nachweis der Dermatophyten *M. canis*, *E. floccosum*, *N. gypseae* und *M. audouinii*

Das System ermöglicht den Nachweis von 19 relevanten Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilzarten Europas [1] davon neun artspezifisch.

Auswahl und Abgrenzung der Erreger (Schema 1) wurde in Absprache mit klinischen Experten getroffen und trägt sowohl zur raschen Abklärung der Krankheitsursache als auch zur situationsgerechten Therapieentscheidung bei.

Gemäß den Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik (MiQ) der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) [2] und der Rili-BÄK 2015 enthält der Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow eine interne Extraktions- und PCR-Amplifikationskontrolle, den Quality Sensor (QS), der im Falle eines negativen Ergebnisses (fehlendes Erreger-Amplifikat) als Negativkontrolle dient. Der geforderte Nachweis der DNA-Sequenzidentität der Amplifikationsprodukte ist durch den Einsatz von Hybridisierungssonden gegeben.

Schema 1: Erregernachweis durch die Module Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow in der Übersicht.



¹⁻³ Vormals: ¹*T. interdigitale/A. vanbreusegehemii*, ²*T. Species* von *A. benhamiae*, ³*M. gypseum*. Neue Nomenklatur nach: Hoog, G.S., Dukik, K., Monod, M. et al. Mycopathologia (2017) 182: 5. doi:10.1007/s11046-016-0073-9

Kit-Inhalt

Inhalt der verschiedenen Mentype® **MycoDerm**^{QS} Lateral Flow PCR-Amplifikationskits für PCR 1, PCR 2, PCR 3 und PCR 2&3 (Anzahl der Reaktionen: jeweils 50)

Kitkomponenten	PCR 1	PCR 2	PCR 3	PCR 2&3
Nuclease-freies Wasser/ Nuclease-free Water	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Reaktionsgemisch A/ Reaction Mix A (REM A)	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Multi Taq2 DNA-Polymerase	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Pimergemisch/ LF Primer Mix PCR 1	50 µl			
Primergemisch/ LF Primer Mix PCR 2		50 µl		25 µl
Primergemisch/ LF Primer Mix PCR 3			50 µl	25 µl
Kontroll-DNA/ LF Control DNA PCR 1	10 µl			
Kontroll-DNA/ LF Control DNA PCR 2		10 µl		10 µl
Kontroll-DNA/ LF Control DNA PCR 3			10 µl	10 µl
LF Quality Sensor (QS)	800 µl	800 µl	800 µl	800 µl
Hybridgemisch/ LF Hybrid Mix PCR 1	10 µl			
Hybridgemisch/ LF Hybrid Mix PCR 2		10 µl		10 µl
Hybridgemisch/ LF Hybrid Mix PCR 3			10 µl	10 µl
Laufpuffer/ LF Running Buffer	5,5 ml	5,5 ml	5,5 ml	5,5 ml
Lateral Flow Streifen/ Lateral Flow Stripes	50 Stk.	50 Stk.	50 Stk.	50 Stk.
Puffer L (conc.)*/ Buffer L	3x 0,6 ml	3x 0,6 ml	3x 0,6 ml	3x 0,6 ml
Puffer N / Buffer N	2x 2 ml	2x 2 ml	2x 2 ml	2x 2 ml

*Resuspendieren Sie den Röhrencheninhalt in einem Volumen von 1,4 ml Nuklease-freiem Wasser (Hierfür nicht das im Kit enthaltene Nuklease-freie Wasser verwenden).

Lagerung

- Das PCR-Kit (PCR-Reagenzien wie REM A, Multi Taq2 DNA-Polymerase , Primergemisch, Nuclease-freies Wasser, Hybridgemisch sowie die Standards (Kontroll-DNA und Quality Sensor (QS)) ist bei -20 °C zu lagern. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden.
- Die Kontroll-DNA muss unbedingt getrennt von den PCR-Reagenzien gelagert werden (Trennung der Bereiche Prä- und Post-PCR zur Vermeidung von Kontaminationen).
- Die Lateral Flow Streifen sind bei Raumtemperatur aufzubewahren.
- Der Lateral Flow Running Buffer (Laufpuffer) ist im Kühlschrank bei 2 - 8 °C zu lagern.
- Die Haltbarkeit des Testkits ist auf dem Verpackungsetikett angegeben.

Anwendungsgebiet

Das Mentype® **MycuDerm**^{QS} **Lateral Flow** Kit ist ein vollwertiges In-vitro-Diagnostikum (IVD) zum Direktnachweis von Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilzen in klinischen Proben bei Verdacht auf Dermatomykose. Als Proben eignen sich Nagelmateriale, Hautschuppen und Haarstümpfe. Der Detektionsbereich der PCRs liegt zwischen 10 pg und 400 pg Erreger-DNA pro Probe.

Mit dem Kit wurden umfangreiche Validierungen, einschließlich einer klinischen Leistungsbewertung gemäß der Anforderungen der In-Vitro Diagnostics Directive 98/79/EC (IVDD), durchgeführt. Eine Konformitätserklärung wurde erstellt und das Kit als CE-IVD durch die zuständige Behörde registriert.

Dieses Produkt ist für die Anwendung durch qualifiziertes Fachpersonal (wie etwa Labortechniker und Ärzte, die in molekularbiologischen Techniken geschult sind) bestimmt. Alle diagnostischen Ergebnisse, die durch Anwendung des Proben-präparationsverfahrens in Verbindung mit einem diagnostischen Test erzielt wurden, sind unter Berücksichtigung anderer klinischer Befunde oder Laborergebnisse auszuwerten.

Bevor Sie beginnen, lesen Sie die gesamte Gebrauchsanweisung bitte sorgfältig durch, denn sie enthält wichtige Informationen. Führen Sie alle Arbeitsschritte genau so durch, wie sie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben werden. Integrieren Sie die hier beschriebenen Prozesse in Ihr eigenes Qualitätsmanagementsystem und validieren Sie diese laborintern.

Um die Abweichungen der diagnostischen Ergebnisse möglichst gering zu halten, sind geeignete Kontrollen mitzuführen.

Sicherheitsinformationen

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Für alle Kitkomponenten können die Sicherheitsdatenblätter bei der Biotype Diagnostic GmbH angefordert werden. Für Sicherheitsdatenblätter von Reagenzien, die nicht im Testkit enthalten sind, kontaktieren Sie bitte den jeweiligen Hersteller bzw. Produktlieferanten und folgen Sie den darin enthaltenen Anweisungen. Auf eine fachgerechte Entsorgung von Probenmaterial und Kitkomponenten ist zu achten.

Folgende potenziell gefährliche Substanzen sind in diesem Testkit enthalten:

Kitbestandteil	Chemikalie	Anteil	Gefährdungen (H) und Vorsichtsmaßnahmen (P)
Puffer L / Buffer L (conc.)	KOH	10 %	<p>GHS05: Gefahr Ätzwirkung // H302 (Gesundheitsschädlich beim Verschlucken), H314 (verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden), GHS07 Achtung! // H290 (kann gegenüber Metallen korrosiv sein)</p> <p>P280 (Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen), P301+309+310 (bei Verschlucken Mund mit Wasser ausspülen, kein Erbrechen herbeiführen), P305+351+338 (bei Kontakt mit den Augen einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen; weiter ausspülen), P309+P310 (bei Exposition oder Unwohlsein sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen)</p>

Qualitätssicherung

Die Qualität der Testkits wird kontinuierlich auf zuvor festgelegte Spezifikationen überprüft, um die uneingeschränkte Verwendbarkeit zu belegen. Bitte kontaktieren Sie uns in allen Fragen zur Qualitätssicherung unter support@biotype.de.

Haftungsausschluss

Wir weisen darauf hin, dass eine Probenverwechslung und/oder Kontamination sowie der nichtsachgemäße Gebrauch des Assays und die Verwendung eines Lesegerätes, das nicht von der Biotype Diagnostic GmbH validiert wurde, zu einer falschen Diagnose führen kann. Eine auf falschen Ergebnissen basierende systemische Behandlung kann unter Umständen zu einer lebensbedrohlichen Schädigung führen. Die Biotype Diagnostic GmbH übernimmt keine Haftung.

2. Übersicht der notwendigen Arbeitsschritte

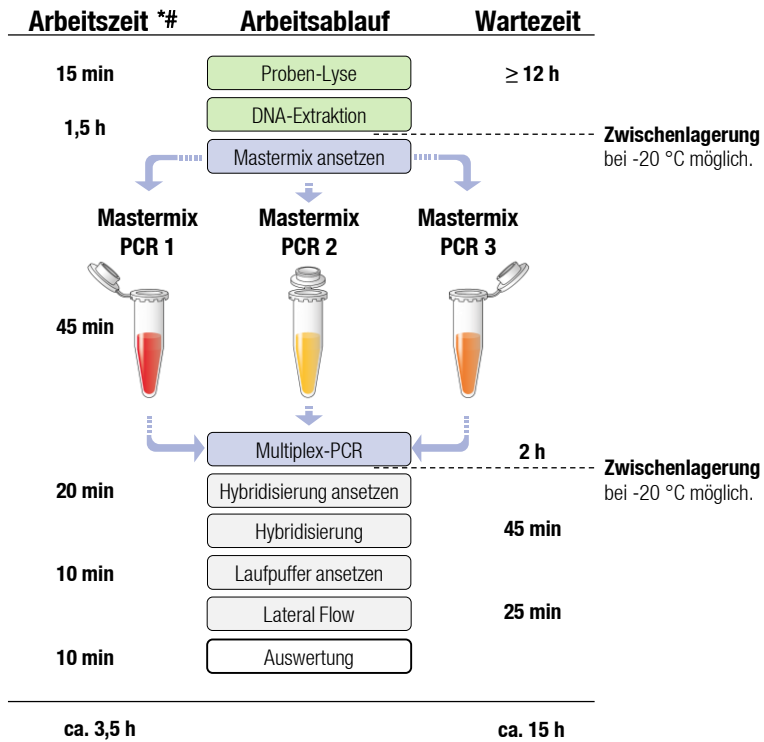


Abbildung 1: Von der Probe bis zum Nachweis – Diagnostik bei Verdacht auf Dermatomykosen mit Hilfe des Mentype® MycoDerm^{DS} Lateral Flow PCR-Amplifikationskits.

*Die Arbeitszeitangabe bezieht sich auf einen Ansatz mit 20 Proben.

- Ermittelt bei qualifiziertem Laborpersonal

3. Weitere Reagenzien und benötigte Ausrüstung

Für die Arbeit im Labor:

- Laborschutzbekleidung (Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille)

Für die Probenaufbereitung und Amplifikation:

- Pipetten* und Pipettenspitzen (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen empfehlen wir die Verwendung von Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere)
- Einmalhandschuhe (puderfrei)
- Heizblock* zur Lyse der Proben (z. B. den Eppendorf® Thermomixer comfort mit einem Thermoblock für 2 ml Mikroreaktionsgefäße)[#]
- Mikro- und Minizentrifuge*
- Vortexer
- Thermocycler mit einer Heizrate von mind. 4 - 6 °C[#]
- Nuklease-freies Wasser

Gewährleisten Sie, dass die erforderlichen Wartungen aller Geräte entsprechend der vom jeweiligen Hersteller vorgeschriebenen Intervalle durchgeführt werden.

Benötigte Reagenzien:

Reagenz	Anbieter*	Bestellnummer
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen GmbH	51304
Ethanol 96 - 100 %	Applichem GmbH	A1868,1000

*Um die sachgemäße Verarbeitung der Proben im Rahmen des Kits zu gewährleisten, empfehlen wir, die Geräte (z. B. Pipetten und Heizblöcke) gemäß den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers zu kalibrieren und warten zu lassen.

[#]Dies ist keine vollständige Lieferantenliste; weitere Laborbedarf-Vertreiber sind nicht aufgeführt.

4. Wichtige Hinweise vor Präparationsbeginn

- Überprüfen Sie die Kit-Komponenten nach Erhalt des Kits auf Beschädigungen.
- Bei Beschädigungen der Puffergefäße wenden Sie sich an den technischen Service der Biotype Diagnostic GmbH oder Ihren Lieferanten. Im Falle von ausgelaufener Flüssigkeit lesen Sie bitte unter "Sicherheitsinformationen" (Seite 9) nach. Verwenden Sie keine beschädigten Kit-Komponenten, da die Leistungsfähigkeit des Kits dadurch beeinträchtigt werden könnte.
- Wechseln Sie nach jedem Pipettierschritt die Pipettenspitzen. Als Schutz vor Kreuzkontaminationen empfehlen wir die Verwendung von Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere.
- Sämtliche Zentrifugationsschritte sind bei Raumtemperatur (15 - 25 °C) durchzuführen.
- Tragen Sie stets Einmalhandschuhe und überprüfen Sie regelmäßig, ob diese mit Probenmaterial kontaminiert sind (ggf. wechseln).
- Entsorgen Sie Handschuhe, falls sie kontaminiert wurden.
- Öffnen Sie immer nur ein Probengefäß, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Kombinieren Sie nicht die Komponenten verschiedener Kits miteinander, es sei denn, die Chargennummern sind identisch.
- Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontamination der Kit-Reagenzien.
- Um das Risiko einer Infektion durch potenziell infektiöses Material so gering wie möglich zu halten, empfehlen wir, bis zur Lyse der Proben unter einer Sterilbank zu arbeiten.
- Dieses Kit sollte nur von Personen verwendet werden, die Erfahrung im Bereich der In-vitro-Labordiagnostik und PCR-Methodik haben.

5. Protokolle zur DNA-Isolierung

Wichtig!

Die Lyse der Patientenproben wird je nach Beschaffenheit in zwei unterschiedlichen Protokollen behandelt.

- **Lyse von Haut-, Haarwurzel- und Nagelspäneproben** siehe Kapitel **5.1.1**
- **Lyse ganzer Nägel** siehe Kapitel **5.1.2**

5.1 Lyse der Patientenproben mit anschließender DNA-Isolierung unter Verwendung von DNA-freien 1,5 ml Standardzentrifugenröhrchen

Für die Isolierung und Aufreinigung der DNA aus Haut-, Haarwurzel-, Nagelspäne- und ganzen Nagelproben sollten stets DNA-Isolierungskits, die auf der Silikamembran-Technologie basieren, verwendet werden. Dabei ist nach den Angaben und Empfehlungen der jeweiligen Hersteller vorzugehen

Bemerkung:

1. Um einen optimalen Gewebeaufschluss zu gewährleisten, empfehlen wir generell die **Inkubation mit Proteinase K über Nacht** oder für mindestens 12 Stunden.
2. Beim **Elutionsschritt ist das Volumen des Elutionspuffers** von zumeist 200 µl auf **50 µl** zu reduzieren.

5.1.1 Lyse von Haut-, Haarwurzel- und Nagelspäneproben mit anschließender DNA-Isolierung

Im Folgenden wird die Probenlyse und DNA-Isolierung unter Verwendung des Qiagen QIAamp® DNA Mini Kits beschrieben.

Zur Vorbereitung des **Lysepuffers** werden pro Probe **180 µl ATL Puffer** und **20 µl Proteinase K** gemischt. Pro Ansatz werden 5% Überschuss kalkuliert, um Pipettierfehler zu kompensieren. Den resultierenden Puffer umgehend weiterverwenden.

Zur Überprüfung der Kontaminationsfreiheit und des Arbeitsablaufes sollte immer eine **Prozesskontrolle** mitgeführt werden. Diese enthält kein Probenmaterial, sondern beispielsweise nur einen Tupfer, wird aber wie eine Probe behandelt und zusammen mit den anderen Proben abgearbeitet. Die Prozesskontrolle dient als Negativkontrolle.

Im Laufe der DNA-Extraktion muss der **Quality Sensor (QS)** zu **jeder Probe** (auch zur Prozesskontrolle) zugegeben werden (siehe Protokoll).

1. **200 µl Lysepuffer** (180 µl ATL* + 20 µl Proteinase K) zum Probenmaterial in ein 1,5 ml Standardzentrifugenröhrchen geben.
2. **15 µl Quality Sensor (QS)** zu jeder Probe geben, dann das Kombigeäß mit dem Deckel verschließen.
3. Im Theroschüttler bei **56 °C** und **850 U/min** die Probe über Nacht oder für mindestens **12 Stunden** inkubieren.
4. **1 min** bei **8.000 U/min** zentrifugieren, um Kondenstropfen im Deckel zu entfernen.
5. **200 µl Puffer AL** zugeben, Deckel verschließen und mischen (**15 s** vortexen).
6. Inkubation bei **70°C** und **850 U/min** für **10 min** im Theroschüttler.
7. **1 min** bei **8.000 U/min** zentrifugieren, um Kondenstropfen im Deckel zu entfernen.
8. **200 µl 96 % Ethanol** zugeben und **15 s** vortexen, danach kurz abzentrifugieren.
9. Überstand (**600 µl Lysat, ohne Pellet**) und abgebrochenen Tupfer in das **QIAamp® Mini Kit Säulchen** überführen und bei **8.000 U/min** für **1 min** zentrifugieren. Danach den Tupfer herausnehmen und Auffanggefäß mit Durchfluss werfen.
10. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein unbenutztes Collection Tube stecken.
11. **500 µl Puffer AW1** zugeben und bei **8.000 U/min** für **1 min** zentrifugieren. Auffanggefäß mit Durchfluss werfen.
12. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein neues Auffanggefäß einstecken.
13. **500 µl Puffer AW2** zugeben und bei **13.300 U/min** für **3 min** zentrifugieren. Auffanggefäß mit Durchfluss werfen.
14. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein neues Auffanggefäß einstecken.
15. Zentrifugation bei **13.300 U/min** für **1 min**.
16. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein frisches, DNA-freies 1,5 ml Standardzentrifugenröhrchen überführen und das Auffanggefäß wegwerfen.
17. **50 µl Puffer AE** zugeben und für **1 min** bei **Raumtemperatur** inkubieren.
18. **1 min** bei **8.000 U/min** zentrifugieren (QIAamp® Mini Kit Filtereinsatz werfen).

Das so gewonnene DNA-Isolat (in 50 µl AE-Puffer) kann direkt für die PCR-Amplifikation verwendet oder bei -20 °C gelagert werden (siehe **Kapitel 5. 2**).

*Puffer fällt bei niedrigen Temperaturen aus. Puffer durch kurzes Erhitzen (56°C) vor Zugabe zur Probe wieder lösen.

5.1.2 Lyse ganzer Nägel mit anschließender DNA-Isolierung

Zur effektiveren Aufarbeitung von Nagelproben (größere/ganze Nägel, insb. dicke Zehennägel) empfehlen wir die Verwendung des Puffers **L** und des Puffers **N**, die dem Mentype® **MycoDerm**^{QS} Kit beiliegen.

Im Folgenden wird die Probenlyse und DNA-Isolierung unter Verwendung des Qiagen QIAamp® DNA Mini Kit beschrieben.

Vor dem ersten Gebrauch ist das Konzentrat des Puffers **L** mit jeweils 1,4 ml Nuklease-freiem Wasser (dafür nicht das im Kit enthaltene Nuklease-freie Wasser verwenden) auf die Gebrauchskonzentration einzustellen. Die Puffer **L** und **N** sollten bei Verwendung Raumtemperatur haben. Der erste kitspezifische Puffer (**ATL**) des DNA-Isolierungskits wird durch den Puffer **L** ersetzt.

Zur Überprüfung der Kontaminationsfreiheit und des Arbeitsablaufes sollte immer eine **Prozesskontrolle** mitgeführt werden. Diese enthält kein Probenmaterial, sondern beispielsweise nur einen Tupfer, wird aber wie eine Probe behandelt und zusammen mit den anderen Proben abgearbeitet.

Im Laufe der DNA-Extraktion muss der **Quality Sensor (QS)** zu jeder Probe (auch zur Prozesskontrolle) zugegeben werden (siehe Protokoll).

1. **100 µl Puffer L** (Mentype® **MycoDerm**^{QS}; auf Gebrauchskonzentration eingestellt; **Raumtemperatur**) zum Probenmaterial in den 1,5 ml Standardzentrifugenröhrchen geben.
2. Im Thermomixer bei **90 °C** und **850 U/min** für **15 min** inkubieren.
3. Proben auf **56 °C** abkühlen lassen und für **1 min** bei **8.000 U/min** zentrifugieren, um die Kondenstropfen im Deckel zu entfernen.
4. **80 µl Puffer N** (Mentype® **MycoDerm**^{QS}; **Raumtemperatur**) und **20 µl** der **Proteinase K** zugeben, Deckel verschließen und mischen (vortexen).
5. **15 µl Quality Sensor (QS)** zu jeder Probe geben und das Kombigefäß mit dem Deckel verschließen.

Die weitere DNA-Extraktion und -Aufreinigung erfolgt analog zum **Kapitel 5.1.1** mit dem **Arbeitsschritt 3** (Inkubation über Nacht).

5.2 PCR-Amplifikation

5.2.1 Ansetzen der Mastermixe PCR 1, PCR 2 und PCR 3

Alle Reagenzien so kurz wie möglich bei Raumtemperatur halten und nach der Verwendung sofort wieder bei -20 °C lagern. Während der Pipettierarbeiten die Reagenzien mit den vorgekühlten ThermoCooler-Racks kühl halten (Farbumschlag des Racks beachten). Vor der Verwendung sind die Reagenzien sowie die hergestellten Reaktionsgemische immer gut zu mischen (vortexen) und kurz zu zentrifugieren (5 sec).

- Das empfohlene Probenvolumen von 1 µl Template-DNA (Isolat aus den Arbeitsschritten in Kapiteln 5.1 ff / 6.1 ff) wird dem Mastermix zugesetzt, um ein Reaktionsvolumen von 25 µl zu erzielen.
- Berücksichtigen Sie bei der Berechnung der Anzahl der PCR-Reaktionen die Negativkontrolle jeweils für die **PCR 1, PCR 2 und PCR 3**. Fügen Sie zur ermittelten Zahl jeweils ein oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierfehler zu kompensieren.

PCR-Mastermixe

Die folgende Tabelle zeigt die Volumina der eingesetzten Kitbestandteile für den einfachen Mastermix-Ansatz der **PCR 1, 2 und 3**:

Komponente	Volumen
Nuclease-freies Water	17,5 µl
Reaction Mix A*	5,0 µl
spez. Primer Mix (PM PCR 1, 2 oder 3)	1,0 µl
Multi Taq2 DNA-Polymerase (hot start, 2,5 U/µl)	0,5 µl
Gesamtvolumen des Mastermixes	24,0 µl

*enthält Mg²⁺, dNTPs, BSA

Hinweise:

Der Detektionsbereich der **PCRs** liegt zwischen 10 pg und 400 pg Erreger-DNA pro Probe. Bei Referenzmaterial und Isolaten von Kulturplatten ist der Einsatz von 1 µl DNA-Isolat (verdünnen auf 250 pg/µl bzw. 100 pg/µl) meist ausreichend.

Bei Patientenmaterial empfehlen wir, das optimale Volumen von 1 µl DNA-Isolat zu verwenden. DNA-Isolate aus Nagelproben empfehlen wir 1:4 verdünnt mit TE-Puffer in der PCR einzusetzen.

Bei Verwendung anderer DNA-Probenvolumina muss das Volumen mit Nuklease-freiem Wasser entsprechend angepasst werden, so dass das Volumen des PCR-Ansatzes 25 µl beträgt.

5.2.2 Positivkontrollen

Um die maximale Sensitivität des Assays zu gewährleisten, ist eine Positivkontrolle für jede PCR (**PCR 1**, **PCR 2** und **PCR 3**) durchzuführen.

- Verdünnen Sie hierfür jeweils die **Kontroll-DNA PCR 1, 2** oder **3** mit dem Verdünnungsfaktor **1:20 in 1x TE-Puffer**.
- Pipettieren Sie **1 µl der verdünnten Kontroll-DNA** anstelle der Template-DNA in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten PCR-Mastermix.

5.2.3 Negativkontrollen

Als Negativkontrolle dient die **Prozesskontrolle**, von der anstelle der Template-DNA jeweils **1 µl** in ein Reaktionsgefäß mit dem vorgelegten PCR-Mastermix für **PCR 1**, **PCR 2** bzw. **PCR 3** pipettiert wird.

Wurde keine Prozesskontrolle mitgeführt, ist eine **PCR-Negativkontrolle** durchzuführen.

- Verdünnen Sie dazu den QS **1:10** mit **1x TE-Puffer**
- Pipettieren Sie **1 µl des verdünnten QS** in ein Reaktionsgefäß mit dem vorgelegten PCR-Mastermix für jede PCR.

In beiden Fällen darf nach der Amplifikation und Hybridisierung neben der QS-Bande keine weitere Bande auf den LF-Streifen sichtbar sein (Abbildung 2).

5.2.4 PCR-Amplifikationsparameter

Die Ansätze **PCR 1/PCR 2/PCR 3** können parallel unter gleichen PCR-Bedingungen amplifiziert werden. Um die Multi Taq2 DNA-Polymerase zu aktivieren und die Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten zu unterdrücken, sollte unbedingt ein „**hot start**“ durchgeführt werden.

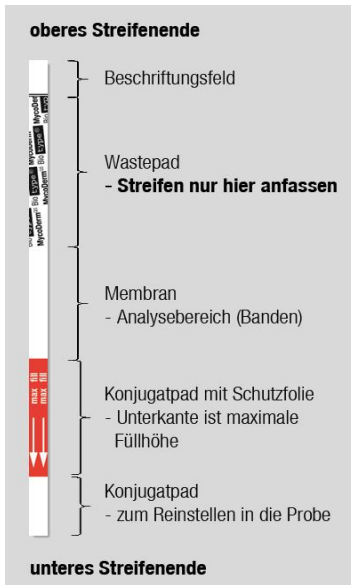
PCR-Programm 1:

Temperatur*	Zeit*	
96 °C	4 min	
		(„hot start“ für Aktivierung der Multi Taq2 DNA-Polymerase)
96 °C	30 s	
60 °C	60 s	35 Zyklen
72 °C	60 s	
10 °C	∞	

*Amplifikationsparameter für Thermocycler mit Silberblöcken oder beschichteten Aluminiumblöcken.

Zur Durchführung der PCR-Amplifikation ist es wichtig, die **Heizrata** (Ramping) des Thermocyclers auf **3 °C/s** einzustellen. Nach erfolgter PCR die Kondensstropfen durch kurzes Zentrifugieren entfernen. Eine Zwischenlagerung der Proben bei -20 °C ist möglich. Die Validierung des Testkits wurde mit dem Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf AG) durchgeführt.

5.3 Lateral Flow



Die Detektion der PCR-Amplifikate erfolgt mittels Lateral Flow Teststreifen (LF-Teststreifen, siehe Abbildung 2). Dafür wird zu jeder PCR der entsprechende Hybrid Mix hinzugegeben und dieser Hybridisierungsansatz anschließend im PCR-Cycler hybridisiert. Danach wird ein Teil des Hybridisierungsansatzes dem Lauf-puffer zugegeben. In dieses Gemisch werden die Lateral Flow Streifen gestellt. Das Reaktionsgemisch wird von den Streifen aufgesaugt und führt zur spezifischen Färbung der entsprechenden Erreger- und Kontroll-bande.

Abbildung 2: Aufbau des Lateral Flow Teststreifen

und Arbeitshinweise

Hinweis:

Die Lateral Flow Teststreifen sind universell und somit für jede der drei PCR-Testmodule einsetzbar. Um mögliche Verwechslungen nach der Hybridisierung zu vermeiden, ist es ratsam, die Streifen vor der Hybridisierung eindeutig mit der Probe und der durchgeführten PCR zu beschriften. Eine weitere Möglichkeit ist die Etablierung eines Farbcodes für jede PCR. Dafür eignen sich handelsübliche farbige Aufkleber, die am oberen Ende des Streifens aufgeklebt und mit der entsprechenden Probenbeschriftung gekennzeichnet werden können.

Die **Teststreifen nur am Beschriftungsfeld oder Wastepad anfassen** um Beschädigungen und / oder Verunreinigungen des Konjugatpads sowie der Membran zu vermeiden.

5.3.1 Verdünnung und Aktivierung der LF Hybrid Mixe

Verdünnen Sie die mitgelieferten LF Hybrid Mixe in 1x TE-Puffer im Verhältnis 1:8 in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß. Berücksichtigen Sie bei der Berechnung der benötigten Menge die Anzahl der zu bearbeitenden Hybridisierungsansätze. Es sollte mindestens ein Volumen von 10 µl im Gefäß sein. Aktivieren Sie die verdünnten LF Hybrid Mixe mit folgenden Parametern:

PCR-Programm 2:

Temperatur	Zeit
98 °C	10 min
25 °C	5 min
10 °C	∞

Nach erfolgter Aktivierung Reaktionsgemisch kurz abzentrifugieren.

5.3.2 Hybridisierung

Herstellung der Hybridisierungsansätze:

1. Zugabe von 1 µl des verdünnten und aktivierten LF Hybrid Mixes zur jeweiligen PCR (z.B. 1 µl verdünnter LF Hybrid Mix **PCR 1** zu jedem 25 µl Amplifikat der **PCR 1**)
2. Hybridisierungsansatz kurz vortexen
3. und kurz abzentrifugieren
4. Hybridisierung im PCR-Cycler mit folgenden Parametern:

PCR-Programm 3:

Temperatur	Zeit
98 °C	10 min
65 °C	20 min
10 °C	∞ maximal 15 min!

Nach erfolgter Hybridisierung Reaktionsgemisch kurz abzentrifugieren.

Hinweise:

Zur Durchführung der Hybridisierung ist es wichtig, die **Heizrate** (Ramping) des Thermocyclers auf **3 °C/s** einzustellen.

Der Kühlschritt sollte **15 min nicht überschreiten**, weil die Gefahr besteht, dass die Hybridisierungsprodukte wieder zerfallen.

Die Aktivierung der LF Hybrid Mixe für die zu bearbeitenden Hybridisierungsansätze muss immer frisch erfolgen. Überzählige aktivierte LF Hybrid Mixe sind zu verwerfen.

5.3.3 Lateral Flow

1. 100 µl Laufpuffer in ein frisches Probengefäß (1,5 ml) pipettieren
2. 10 µl vom Hybridisierungsansatz zu den 100 µl Laufpuffer geben
3. Kurz vortexen und anschließend abzentrifugieren
4. LF-Teststreifen am oberen Ende (Biotype / **MycoDerm**^{OS} Schriftzug) festhalten
5. LF-Teststreifen mit dem unteren Ende (weiße Pfeile nach unten) in die Probelösung stellen
6. bei Raumtemperatur für 25 min inkubieren und
7. danach den LF-Teststreifen ablesen

Hinweis:

Nach ca. 2 h sind die LF-Teststreifen vollständig getrocknet und können archiviert werden. Die Bandenintensität kann während der Trocknung etwas nachlassen.

5.4 Auswertung

Ein erfolgreiches Experiment zeichnet sich durch die sichtbare Bande des Quality Sensors (QS) bei allen Teststreifen aus. Diese Bande dient zugleich als DNA-Extraktionskontrolle, Amplifikations- und Inhibitionskontrolle für die PCR sowie als Laufkontrolle zum Nachweis der Funktionalität des Lateral Flow Teststreifens.

Die Validität des Testes ist gewährleistet, wenn die Prozesskontrolle außer der QS-Bande keine zusätzlichen Banden aufweist und die Positivkontrollen entsprechend mitgeführt wurden (Abbildung 3).

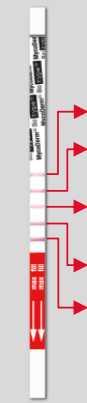
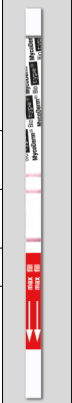



Referenzstreifen	Erregerbanden PCR 1	Erregerbanden PCR 2	Erregerbanden PCR 3	Positivkontrollen			Prozesskontrolle
				PCR 1	PCR 2	PCR 3	
	Quality Sensor (QS), [DNA-Extraktions- und PCR-Inhibitionskontrolle]						
	Dermatophyten (TMEN)	<i>T. tonsurans</i>	<i>M. canis</i>				
	<i>S. brevicaulis</i>	<i>T. interdigitale</i> <i>T. mentagrophytes</i>	<i>E. floccosum</i>				
	<i>Candida</i> spp.	<i>T. violaceum</i>	<i>N. gypsea</i>				
	<i>T. rubrum</i>	<i>T. benhamiae</i> <i>T. erinacei</i> <i>T. verrucosum</i>	<i>M. audouinii</i>				

Abbildung 3: Lateral Flow Teststreifen mit dem jeweils typischen Bandenmuster der Positivkontrollen aus PCR1, 2 und 3 (keine Originalstreifen).

Der in Abbildung 3 dargestellte Referenzstreifen dient der Darstellung aller Erregeramplifikate aus der **PCR 1, 2 und 3**. Der Referenzstreifen ist nicht in Originalgröße abgebildet. Zusätzlich sind die Positivkontrollen sowie die Prozesskontrolle in der Abbildung 3 zu sehen. Bei dem Referenzstreifen, den Positivkontrollen und der Prozesskontrolle entspricht die obere Bande dem Quality Sensors (QS). Die Auswerteprotokolle sind für die korrekte Zuordnung und Bestimmung der Amplifikatbanden anzufordern.

6. Alternativ-Protokolle für die Lyse der Patientenproben mit anschließender DNA-Isolierung

Die Lyse der Patientenproben wird je nach Beschaffenheit in zwei unterschiedlichen Protokollen behandelt.

- **Lyse von Haut-, Haarwurzel- und Nagelspäneproben** siehe Kapitel **6.1.1**
- **Lyse ganzer Nägel** siehe Kapitel **6.1.2**.

6.1 Lyse der Patientenproben mit anschließender DNA-Isolierung unter Verwendung von Sampletype i-sep® SQ

Für die Isolierung und Aufreinigung der DNA aus Haut-, Haarwurzel-, Nagelspäne- und ganzen Nagelproben sollten stets DNA-Isolierungskits, die auf der Silikamembran-Technologie basieren, verwendet werden. Dabei ist nach den Angaben und Empfehlungen der jeweiligen Hersteller vorzugehen.

Bemerkung:

1. **Im Laufe der DNA-Extraktion** muss der **Quality Sensor (QS) zu jeder Probe** (auch der Prozesskontrolle) zugegeben werden (siehe Protokoll).
2. Um einen optimalen Gewebeaufschluss zu gewährleisten, empfehlen wir generell die **Inkubation mit Proteinase K über Nacht** oder für mindestens 12 Stunden.
3. Beim **Elutionsschritt ist das Volumen des Elutionspuffers** von zumeist 200 µl auf **50 µl** zu reduzieren.

6.1.1 Lyse von Haut-, Haarwurzel- und Nagelspäneproben mit anschließender DNA-Isolierung

Im Folgenden wird die Probenlyse und DNA-Isolierung unter Verwendung des Qiagen QIAamp® DNA Mini Kits beschrieben.

Zur Vorbereitung des **Lysepuffers** werden pro Probe **180 µl ATL Puffer** und **20 µl Proteinase K** gemischt. Pro Ansatz werden 5% Überschuss kalkuliert, um Pipettierfehler zu kompensieren. Den resultierenden Puffer umgehend weiterverwenden.

Zur Überprüfung der Kontaminationsfreiheit und des Arbeitsablaufes sollte immer eine **Prozesskontrolle** mitgeführt werden. Diese enthält kein Probenmaterial, sondern beispielsweise nur einen Tupfer, wird aber wie eine Probe behandelt und zusammen mit den anderen Proben abgearbeitet.

1. **200 µl Lysepuffer** (180 µl ATL* + 20 µl Proteinase K; vorgewärmt auf **56 °C**) zum Probenmaterial in den Filtereinsatz des Sampletype **i-sep® SQ** Probenahmeröhrchen geben.
2. **15 µl Quality Sensor (QS)** zu jeder Probe geben und das Kombigefäß mit dem Deckel verschließen.
3. Im Thermoschüttler bei **56 °C** und **850 U/min** die Probe über Nacht oder für mindestens **12 Stunden** inkubieren.
4. **1 min** bei **max. 500 U/min** zentrifugieren, um Kondensstropfen im Deckel zu entfernen.
5. **200 µl Puffer AL** zugeben, das Kombigefäß mit dem Deckel verschließen und mischen (**15 s** vortexen).
6. Im Thermoschüttler bei **70 °C** und **850 U/min** für **10 min** inkubieren.
7. Das Kombigefäß für **1 min** bei **13.300 U/min** zentrifugieren.
8. **Filtereinsatz verwerfen** und Auffanggefäß verschließen.
9. **200 µl 96 % Ethanol** dem Filtrat im Auffanggefäß zugeben, **15 s** vortexen und danach kurz abzentrifugieren.
10. Den Überstand (**600 µl Lysat, ohne Pellet**) und abgebrochenen Tupfer in das **QIAamp® Mini Kit Säulchen** überführen und bei **8.000 U/min** für **1 min** zentrifugieren. Tupfer und Auffanggefäß mit Durchfluss verwerfen.
11. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein neues Collection Tube einstecken.
12. **500 µl Puffer AW1** zugeben und bei **8.000 U/min** für **1 min** zentrifugieren. Auffanggefäß mit Durchfluss verwerfen.
13. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein neues Auffanggefäß einstecken.
14. **500 µl Puffer AW2** zugeben und bei **13.300 U/min** für **3 min** zentrifugieren. Auffanggefäß mit Durchfluss verwerfen.
15. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein neues Auffanggefäß einstecken.
16. Zentrifugation bei **13.300 U/min** für **1 min**.
17. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein frisches, DNA-freies 1,5 ml Standardzentrifugenröhrchen transferieren und das Auffanggefäß wegwerfen.
18. **50 µl Puffer AE** mittig auf die Säule geben und für **1 min** bei **Raumtemperatur** inkubieren.

* Puffer fällt bei niedrigen Temperaturen aus. Puffer durch kurzes Erhitzen (56 °C) vor Zugabe zur Probe wieder lösen.

19. **Bei 8.000 U/min** für **1 min** zentrifugieren (QIAamp® Mini Kit Säulchen wegwerfen).

Das so gewonnene DNA-Isolat (in 50 µl AE Puffer) kann direkt für die PCR-Amplifikation verwendet oder bei -20 °C gelagert werden (siehe **Kapitel 5.2**).

6.1.2 Lyse ganzer Nägel mit anschließender DNA-Isolierung unter Verwendung von Sampletype i-sep® SQ

Zur effektiveren Aufarbeitung von Nagelproben (größere/ganze Nägel, insb. dicke Zehennägel) empfehlen wir die Verwendung des Puffers **L** und des Puffers **N**, die dem Mentype® MycoDerm^{QS} Kit beiliegen.

Im Folgenden wird die Probenlyse und DNA-Isolierung unter Verwendung des Qiagen QIAamp® DNA Mini Kits beschrieben.

Vor dem ersten Gebrauch ist das Konzentrat des Puffers **L** mit jeweils 1,4 ml Nuklease-freiem Wasser (dafür nicht das im Kit enthaltene Nuklease-freie Wasser verwenden) auf die Gebrauchskonzentration einzustellen. Die Puffer **L** und **N** sollten bei Verwendung Raumtemperatur haben. Der Puffer **L** ersetzt den kitspezifischen Puffer (**ATL**) des DNA-Isolierungskits.

Zur Überprüfung der Kontaminationsfreiheit und des Arbeitsablaufes sollte immer eine **Prozesskontrolle** mitgeführt werden. Diese enthält kein Probenmaterial, sondern beispielsweise nur einen Tupfer, wird aber wie eine Probe behandelt und zusammen mit den anderen Proben abgearbeitet.

Im Laufe der DNA-Extraktion muss der **Quality Sensor (QS)** zu **jeder Probe** (auch zur Prozesskontrolle) zugegeben werden (siehe Protokoll).

1. **100 µl Puffer L** (Mentype® MycoDerm^{QS}; auf Gebrauchskonzentration eingestellt; **Raumtemperatur**) zum Probenmaterial in den in den Filtereinsatz des Sampletype i-sep® SQ Probenahmeröhrchen geben.
2. Im Thermomixer bei **90 °C** und **850 U/min** für **15 min** inkubieren.
3. Das Probenmaterial auf **56 °C** abkühlen lassen und die Kondensstropfen im Deckel durch Zentrifugieren für **1 min** bei **max. 500 U/min** entfernen.
4. **80 µl Puffer N** (Mentype® MycoDerm^{QS}; **Raumtemperatur**) und **20 µl** der **Proteinase K** zugeben, mit dem Deckel verschließen und mischen (vortexen).
5. **15 µl Quality Sensor (QS)** zu jeder Probe geben und das Kombigefäß mit dem Deckel verschließen.

Die weitere DNA-Extraktion und -Aufreinigung erfolgt analog zum **Kapitel 6.1.1** mit dem **Arbeitsschritt 3** (Inkubation über Nacht).

7. Problembehandlung

7.1 PCR-Amplifikation

Verwendung von Thermocyclern mit unbeschichteten Aluminiumblöcken:

Fehlt die Bande für das PCR-Produkt und/oder der QS einer Probe, überprüfen Sie bitte, welchen Block Ihr Thermocycler hat. Wenn Sie Thermocycler mit unbeschichteten Aluminiumblöcken verwenden, nutzen Sie bitte folgende PCR-Parameter:

Temperatur	Zeit	
96 °C	4 min	
	(„ hot start “ für Aktivierung der Multi Taq2 DNA-Polymerase)	
96 °C	30 s	
60 °C	120 s	35 Zyklen
72 °C	75 s	
10 °C	∞	bis zum Ende

Zur Durchführung der PCR-Amplifikation ist es wichtig, die **Heizrata** (Ramping) des Thermocyclers auf **3 °C/s** einzustellen.

PCR-Produkt vorhanden, QS-Bande unterdrückt oder fehlt komplett:

Bei zu hoher Konzentration an Erreger-DNA in der PCR kann die Bande des Quality Sensors - bei sichtbarer spezifischer Erregerbande - unterdrückt sein. Um die Validität der Reaktion sicherzustellen, sollte die PCR mit verdünnter Proben-DNA (z.B. 1:4) wiederholt werden, so dass die QS-Bande sicher dargestellt wird.

Hinweis zur Auswertung der Prozeßkontrolle (Negativkontrolle):



Die Prozesskontrolle (Negativkontrolle) enthält nur die sichtbare Bande des Quality Sensors (QS).

Bei der Auswertung der Lateral Flow Streifen ist ein nicht homogenen Farbniederschlag, der in schwacher Form in Höhe der *T. rubrum*-Bande auftreten kann, zu vernachlässigen. Es handelt sich um keine Kontamination, da die TMEN-Bande fehlt.

Die Darstellung der Prozesskontrolle mit der sichtbaren Bande des Quality Sensors (QS) und dem schwachen Farbniederschlag ist in Abbildung 4 gezeigt.

Bei Auftreten einer TMEN- Bande ohne bzw. mit einer *T. rubrum*- Bande handelt es sich im Falle der Prozesskontrolle um eine Kontamination. Dieses Erscheinungsbild darf nur bei einer *T. rubrum*- oder TMEN-positiven Probe auftreten (siehe Abbildung 5+6). Es handelt sich ebenfalls um eine Kontamination, wenn Sie an Position 2 oder 3 nach dem Konjugatpad eine Bande detektieren. Die Reagenzien sind kontaminiert. Bitte leiten Sie die entsprechenden Maßnahmen ein.

Abbildung 4: Lateral Flow Teststreifen mit QS-Bande und schwachem unspezifischem Farbumschlag.

Maßnahmen bei kontaminierten Reagenzien:

- Verwenden Sie immer frisch pipettierte Reaktionsansätze.
- Vergewissern Sie sich, dass die Pipetten nicht kontaminiert sind; diese sollten regelmäßig gesäubert/sterilisiert werden.
- Verwenden Sie Filterspitzen, um Kontaminationen zu vermeiden.
- Verwenden Sie je einen eigenen Pipettensatz für die Prä- und Post-PCR-Bearbeitung.
- Verschließen Sie nach Bearbeitung jeweils die einzelnen Reaktionsansätze.
- Wechseln Sie regelmäßig die Handschuhe.

Hinweise zur Auswertung einer *T. rubrum*- oder TMEN-positiven PCR 1



PCR 1 enthält an Position 4 nach dem Konjugatpad eine Detektionszone zum gruppenspezifischen Nachweis der Dermatophyten *in sensu stricto* *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, und *Nannizzia* (TMEN-Zone). Im Sensitivitätsbereich der beobachteten unspezifischen *T. rubrum*-Zone muss in Anwesenheit des Erregers *T. rubrum* ebenfalls eine positive TMEN-Zone nachgewiesen werden. Das TMEN-Signal dient somit als Bestätigungstest für *T. rubrum*, sodass ein falsch-positives Ergebnis für diesen Erreger ausgeschlossen werden kann.

Bitte achten Sie bei der Auswertung der Lateral Flow Streifen darauf, dass der Nachweis des Erregers *T. rubrum* nur in Verbindung mit der TMEN-Bande positiv zu bewerten ist und dass die Intensität der Bandenfärbung bei der TMEN-Bande und der *T. rubrum*-Bande ähnlich ausfällt. Abbildung 5 zeigt die entsprechende visuelle Darstellung der positiven Detektion des Erregers *T. rubrum*. Die Lateral Flow Teststreifen mit den entsprechenden Bandenmustern sind in Abbildung 3 auf Seite 21 dargestellt.

Abbildung 5: Lateral Flow Teststreifen mit dem typischen Bandenmuster der Positivkontrolle aus PCR1 (Originalstreifen).



PCR 1 enthält an Position 4 nach dem Konjugatpad eine Detektionszone zum gruppenspezifischen Nachweis der Dermatophyten in sensu stricto *Trichophyllum*, *Microsporum*, Epidermophyton, und Nannizzia (TMEN-Zone). Das TMEN-Signal dient als Bestätigungstest für den gruppenspezifischen Nachweis.

Das Auftreten eines schwachen Farbniederschlags in der Höhe der ersten Nachweisbande nach dem Konjugatpad bei PCR1 (Höhe *T. rubrum*) mit einer Farbtintensität (schwache Ausprägung), die nicht der der TMEN-Bande entspricht (siehe Abbildung 6), ist als negativ hinsichtlich *T. rubrum*-Detektion zu bewerten. Bitte führen Sie aufgrund der positiven TMEN-Bande die Mentype® **MycoDerm**^{QS} **Lateral Flow** PCR 2 und 3 Test's durch.

Abbildung 6 Lateral Flow Teststreifen mit dem Quality Sensor (obere Bande), der TMEN-Bande und einem schwach ausgeprägten Farbumschlag in Höhe *T.rubrum* (blau markiert) (Originalstreifen)

TMEN-Bande in PCR1 vorhanden, keine weiteren Erregerbanden in PCR 2 und PCR 3 detektiert

Wenn das gewonnene Probenmaterial eine zu geringe Konzentration an Erreger-DNA aufweist, kann ein Art-spezifischer Nachweis nicht erfolgen. Die Konzentration der Erreger-DNA liegt in diesem Falle unterhalb der Nachweisgrenze (10 pg).

Bitte stellen Sie sicher, dass die Probenahme richtig erfolgt und ausreichend Material zur Verfügung steht.

Keine Bande detektiert und QS-Bande fehlt (auch in der Negativkontrolle):

Fehler im Setup:

- Überprüfen Sie, ob alle Reagenzien mit angegebenen Volumina und Konzentration zugegeben und die Lagerbedingungen der Reagenzien eingehalten wurden.
- Vor Beginn der PCR sollten die Reagenzien gut gemischt und abzentrifugiert werden.
- PCR mit neuem Reaktionsansatz wiederholen.
- Bei Proben (Nagel, Haut, Haarwurzeln) von anbehandelten Patienten wird empfohlen, die PCR mit der 1:4 verdünnten Patientenprobe zu wiederholen, um die Konzentration möglicherweise vorhandener Inhibitoren zu verringern.
- Häufige Frieren-Tauen-Zyklen können negativen Einfluss auf die Stabilität der Reagenzien haben.

Fehler des PCR-Gerätes (Amplifikation ist nicht erfolgt):

- Überprüfen Sie, ob das richtige PCR-Programm gewählt bzw. programmiert wurde.
- Überprüfen Sie die Funktionsfähigkeit des PCR-Gerätes und ob alle Wartungen vorschriftsmäßig durchgeführt wurden.

Verdunstung der Probe während der PCR (Augenprobe, ob Reaktionsansatz nach PCR noch Anfangsvolumen enthält):

- Deckelheizung muss aktiviert sein (105 °C empfohlen).

Defekter LF-Teststreifen:

- Überprüfen Sie den Teststreifen auf optische Mängel (Knicke, Risse, abgekratzte Membran o.ä.)
- Überprüfen Sie das mitgelieferte Trockenmittel in der Verpackung der Teststreifen auf rosa Verfärbungen. Eine Verfärbung weist daraufhin, dass die Röhrchen nicht richtig verschlossen waren und die Streifen somit bei zu hoher Luftfeuchtigkeit gelagert wurden. Dies kann zu einem Funktionsverlust der Teststreifen führen.

Konzentration an humaner DNA in der Probe ist zu hoch (Background):

- Stellen Sie bei der Probennahme sicher, dass hauptsächlich pilzliches Material entnommen wird.

Kreuzreaktivität durch verschiedene Cycler bei klinisch-atypisch hohen Konzentrationen

PCR 3

- Eine schwache falsch-positive Bande für *Microsporium audouinii* durch äußerst hohe Konzentrationen von *Microsporium ferrugineum*

PCR 2:

- Eine schwache falsch-positive Bande für *T. violaceum* durch äußerst hohe Konzentrationen von *T. rubrum*

PCR 1

- Eine schwache falsch-positive Bande für *Candida spp.* durch äußerst hohe Konzentrationen von *Fusarium spp./Penicillium spp.* oder *Malassezia spp./Alternaria mali*

Bei den kreuzreaktiven Erregern in PCR 1 handelt es sich um kommensale Begleitflora der menschlichen Hautoberfläche bzw. saprophytische Keime, die in diesen hohen Konzentrationen insbesondere bei sachgemäßer Probenahme nicht zu erwarten sind.

7.2 Hinweise zur Probennahme und Probenlyse

Generell erfolgt die Probenentnahme unter sterilen Bedingungen. Auf geeignete Arbeitsschutzmaßnahmen im Umgang mit potentiell infektiösen Patientenproben ist zu achten.

Desinfektion: Da sich auf Haut, Nägeln und Haaren nicht pathogene Anflugkeime befinden können, sollte vor Probenentnahme eine gründliche Säuberung und Desinfektion des mykoseverdächtigen Herdes mit einem Tupfer und 70%igem Ethanol erfolgen (Reduktion der kontaminierenden Begleitflora).

Materialmenge: Nach Trocknung der desinfizierten Stelle sollte ausreichend Material entnommen werden, da Pilze nesterweise auftreten. Es sollte immer Material in der Nähe der Wachstumszone der Pilze entnommen werden (Grenzfläche zwischen mykotischer Veränderung und gesundem Haut- bzw. Nagelareal). Im Gegensatz zur klassischen Pilzdiagnostik, welche die Gewinnung lebenden Pilzmaterials voraussetzt, sind für den molekulargenetischen Nachweis zusätzlich auch gröbere Hautschuppenauflagerungen, Borken, Krusten und Nagelspäne ohne vitale Pilzelemente geeignet. Auch dieses Material enthält noch deutliche Mengen an nachweisbarem Erbmaterial.

Technik: Zur Materialentnahme von infektiösen Hautpartien werden Schuppen in Richtung der Pilzwachstumszone mit einem sterilen Skalpell, einer Kürette oder einem scharfen Löffel entnommen.

Bei Onychomykosen gilt, je feinspäniger das Material, desto erfolgreicher die Ausbeute an pilzlicher DNA. Leicht ablösbare bröcklige Teile sollten entfernt (Nagel ggf. mit Schere kürzen) und verworfen werden. Das Material (Nagelspäne) muss aus den befallenen Arealen der Nagelplatte, am Übergang vom "kranken" zum "gesunden" Gewebe, abgetragen werden.

Tiefere Nagelpartien nahe dem Nagelbett und subunguale Hyperkeratosen sollten mit einbezogen werden. Bei der weißen superfiziellen Onychomykose muss das Material durch Abkratzen oder Fräsen der weißen Flecken gewonnen werden.

Bei der Entnahme von Haaren sollten vorhandene Eiterkrusten vorsichtig entfernt und die Haare auf ca. 3 – 5 mm Länge gekürzt werden. Die abgeschnittenen Haare werden verworfen. Danach 10 - 20 Haarstümpfe mit der Epilationspinzette entnehmen (**Haarwurzeln müssen vorhanden sein!**). Falls notwendig sollten die Haarstümpfe "ausgegraben" werden. Bereiche mit auffälligen Haaren, z. B. grau, entfärbt, glanzlos, weißliche Hülle oder abgebrochen, bevorzugt beproben.

Für die Aufnahme des entnommenen Materials, die Durchführung der Lyse und zur Gewinnung eines partikelfreien DNA Lysates bieten wir das Probenahme- und Prozessiergefäß Samplettype i-sep® SQ (Biotype Diagnostic GmbH; Bestellnummer 61-00201-0050 bzw. 63-00201-0050) an. Hierbei wird die gewonnene Patientenprobe mit dem mit sterilen Wasser angefeuchteten Tupfer aufgenommen und in den Filtereinsatz des Kombiergefäßes überführt.

Hinweis! Bitte verwenden Sie für die Probenaufnahme **keine Wattetupfer**.

Wir bieten dafür entsprechende beflockte Tupfer sowie weitere Prozessierungsbestecke an.
Bitte kontaktieren Sie uns bei weiteren Fragen.

8. Referenzen

- [1] **Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B.** Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 166, 335-352, 2008.
- [2] **Reischl U, Drosten C, Geißdörfer W, Göbel U, Hoffmann KS, Mauch H, Meyer T, Moter A, von Müller L, Panning M, Rabenau HF, Reiter-Owona I, Roth A, Weitz M.** MiQ 1-2011, Nukleinsäure-Amplifikationstechniken. In: Podbielski A, Hermann M, Kniehl E, Mauch H, Rüssmann H (Hrsg.) Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ). Im Auftrag der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). 3. Auflage. Elsevier / Urban & Fischer, München, 2011.

9. Symbole



Hersteller



Bestellnummer



Inhalt ausreichend
für n Reaktionen



In-vitro-Diagnostika



Gebrauchsanweisung
beachten

Spezifikationen des Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow PCR-Amplifikationskits

A Analytische Validierung

A a) Prüfmittel

PCR-Kit: Das Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow PCR-Amplifikationskit wurde gemäß Anleitung eingesetzt (siehe Gebrauchsanweisung).

DNA-Konzentrationsbestimmung: DNA-Konzentrationen wurden UV/VIS-spektral-photometrisch unter Verwendung des *NanoDrop® ND-1000* (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt (A_{260}). Als ein wichtiges Qualitätskriterium für die DNA gilt das Verhältnis A_{260} / A_{280} . Dies lag zwischen 1,7 und 2,0.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Für die PCR 1, PCR 2 und PCR 3 wurde standardmäßig der Thermocycler *Eppendorf Mastercycler ep* (Eppendorf AG, Hamburg) verwendet (Standardcycler Validierung).

Hybridisierung: Für die PCR wurde standardmäßig der Thermocycler *Eppendorf Mastercycler ep* (Eppendorf AG, Hamburg) verwendet (Standardcycler Validierung).

Lateral Flow: Der Aufbau des Lateral Flow Teststreifens und die Arbeitshinweise wurden in dieser Gebrauchsanweisung ausführlich beschrieben.

Quality Sensor und Kalibratoren: Der Quality Sensor (QS) und die Kontroll-DNA für PCR 1, PCR 2 und PCR 3 (Positivkontrollen) wurden gemäß Anleitung verwendet (siehe Gebrauchsanweisung). Die PCR-Amplifikate der Positivkontrollen wurden genutzt, um die Nachweisgrenze von 10 pg zu garantieren.

A b) Testung der analytischen Spezifität

Zielsetzung: Die Untersuchungen dienten dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse infolge Kreuzreaktivität mit saprophytischen Keimen und humaner DNA.

Methodik: Die analytische Spezifität wurde mit den in Anlage 1 aufgeführten Bakterien- und Pilzstämmen bei 500 pg genomischer DNA getestet. Zusätzlich wurde 500 pg genomische DNA von *Bos taurus* (Rind), *Canis lupus familiaris* (Hund), *Felis catus* (Katze) und *Cavia porcellus* (Meerschweinchen) getestet. DNA aus Tieren stammte von Blutproben, welche als Restmaterial veterinärmedizinischer Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurden. Humane DNA aus Blutproben wurde in einer Verdünnungsreihe bis 100 ng pro PCR getestet.

Ergebnisse: Humane DNA zeigte bis 100 ng pro PCR keine Reaktivität. Ebenfalls wurde bei keinem der getesteten Referenzstämmen sowie der tierischen und bakteriellen Begleitflora eine Kreuzreaktivität festgestellt. Die interne Amplifikationskontrolle QS (Quality Sensor) wurde immer nachgewiesen.

A c) Testung der analytischen Sensitivität

Zielsetzung: Die Untersuchungen dienten der Bestimmung der analytischen Nachweisgrenze (Sensitivität). Dabei erfolgt die Testung von DNA aus Referenzstämmen, Begleitflora und Wirtszellen.

Methodik: Es wurde eine Verdünnungsreihe von 50 ng, 10 ng, 2 ng, 400 pg, 80 pg, 16 pg und 3,2 pg genomischer DNA in allen drei PCRs mit den jeweiligen Referenzstämmen in Einfachbestimmung getestet.

Ergebnisse: Für den Nachweis aller Erreger wurde insgesamt eine analytische Sensitivität von mindestens 10 pg genomischer DNA, bei *M. audouinii* von mindestens 50 pg genomischer DNA erreicht. Bei 50 ng genomischer DNA von *T. rubrum* kann die Bande des Quality Sensors bei sichtbarer spezifischer Erregerbande unterdrückt sein. Um die Validität der Reaktion sicherzustellen, sollte diese PCR mit verdünnter Proben-DNA (z. B. 1:4) wiederholt werden, so dass die QS-Bande sicher dargestellt wird. Dieser Hinweis ist in der Gebrauchsanweisung des Assays enthalten.

A d) Testung verschiedener DNA-Mischproben (Matrixeffekte)

Zielsetzung: In klinischen Proben ist davon auszugehen, dass ein Überschuss an humaner DNA vorliegen kann. Außerdem besteht die Möglichkeit einer Mischinfektion zweier unterschiedlicher Erreger. Da die PCR einer Endproduktthemung unterliegt, wurden die analytische Sensitivität und Spezifität auch in Gegenwart humaner DNA und eines zweiten Erregers getestet.

Methodik: Alle nachzuweisenden Erreger wurden in einem PCR-Ansatz mit 10 pg fungaler genomischer DNA im Gemisch mit 100 ng humaner genomischer DNA getestet. Des Weiteren wurden Pilz-DNA Gemische aus *T. rubrum* und *C. albicans* mit folgenden variablen DNA-Mengen getestet (jeweils eine DNA im Überschuss), da hauptsächlich diese beiden Erreger in Kombination vorkommen (siehe Klinische Leistungsbewertungsprüfung). Außerdem wurde in allen verwendeten Thermocyclern NTCs (no template control) mit 100 ng humaner genomischer DNA untersucht.

Erreger	DNA Mengen pro PCR-Ansatz [pg]								
<i>T. rubrum</i>	1000	500	250	100	50	10	50	50	50
<i>C. albicans</i>	10	10	10	10	10	10	50	100	250

Ergebnisse: In Gegenwart von 100 ng humaner DNA wurde in allen drei PCRs auf dem Standardvalidierungsthermocycler *Eppendorf Mastercycler ep* (Eppendorf AG, Hamburg) der interne Quality Sensor QS sicher und ohne Produkthemmung dargestellt. In der Klinischen Studie (siehe Kapitel B) konnte gezeigt werden, dass der erregerspezifische DNA-Nachweis von *Trichophyton spp.* und *Candida spp.* inklusive einer QS-Bande auch bei einem Überschuss humaner DNA zwischen 100 ng und bis zu 10 µg sicher erfolgt. Es wurde eine Sensitivität von mindestens 10 pg erregerspezifischer DNA in Gegenwart von 100 ng humaner DNA erreicht.

In den Gemischen mit erregerspezifischen DNAs wurde die Nachweisgrenze von 10 pg *C. albicans*-DNA bei einem Überschuss von bis zu 1 ng *T. rubrum*-DNA erreicht. Bei einem Gemisch von jeweils 10 pg *T. rubrum* und *C. albicans* werden beide Erreger sicher detektiert. Bei einem Überschuss von bis zu 250 pg *C. albicans*-DNA lag die Nachweisgrenze von *T. rubrum*-DNA bei 50 pg. Dennoch konnten in der Klinischen Leistungsbewertungsprüfung zwei Patientenproben mit Mischinfektionen von *T. rubrum* und *Candida spp.* nachgewiesen werden, obwohl die *T. rubrum*-DNA-Konzentration nur zwischen 1,6 pg und 11,6 pg DNA lag.

Kreuzreaktivität und Amplifikathemmung wurde in keiner der aufgeführten Mischungen festgestellt. Die beiden Erreger wurden auch im Gemisch sicher dargestellt, d. h. bei den fungalen Mischproben in den obenstehenden Konzentrationen konnten alle Banden inklusive der QS-Bande detektiert werden.

A e) Testung des Einflusses verschiedener Annealingtemperaturen in der PCR

Zielsetzung: Zur Bestimmung der Robustheit der PCRs wurden Temperaturschwankungen für den Primeranlagerungsschritt (Annealing) der PCRs simuliert. Dieser Temperaturschritt ist kritisch für die Sensitivität und Spezifität der PCRs. Als Akzeptanzkriterium galt: keine sichtbaren Störsignale sowie vergleichbare spezifische Bandenstärke zur Standardreaktion und QS immer sichtbar.

Methodik: Die Primeranlagerungstemperaturen in der PCR wurden um ± 1 °C und um ± 2 °C (zusätzlich -5 °C) um die kitspezifische Annealingtemperatur variiert. Es wurde die Standardreaktion mit Kontroll-DNAs in der Nennkonzentration (50 pg) mit je einer einfachen Bestimmung mit gleichem PCR-Master Mix zeitlich parallel in baugleichen Cyclern (Eppendorf Matercycler ep 1 + 2) durchgeführt.

Ergebnisse: PCR 1 zeigte keine sichtbare Änderung der spezifischen Bandenstärke bei allen verwendeten Annealingtemperaturen. PCR 2 und 3 erfüllten ebenfalls die Kriterien, wobei *A. benhamiae*/*T. verrucosum* (PCR 2) bei 62 °C und *M. canis* sowie *M. audouinii* (PCR 3) bei 58 °C schwächere Signale erbrachten. Bei Abweichungen von ± 1 °C von der Standardannealing-

temperatur traten keine Änderungen der spezifischen Bandenstärke auf. Der QS wurde in allen Reaktionen dargestellt; Störsignale traten keine auf.

A f) Testung der Kurzzeitstabilität

Zielsetzung: Die Stabilität der Reagenzien des PCR-Kits wurde nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen getestet.

Methodik: Die Kitreagenzien wurden einem 20fachen Einfrier- und Auftauzyklus unterworfen. Das Einfrieren wurde mindestens für 1 h bei -20 °C durchgeführt. Aufgetaut wurde bei Raumtemperatur (auch mindestens 1 h) und die Reagenzien wurden vor Gebrauch durch Schütteln homogenisiert. Anschließend wurden die PCR 1, 2 und 3 mit den jeweiligen Kontroll-DNAs in einer Endkonzentration von 10 pg bzw. 50 pg pro Reaktionsansatz durchgeführt.

Ergebnisse: Die PCR-Amplifikate aller Organismen konnten korrekt detektiert werden. Die reinen QS-Proben und die mitgeführten NTCs (no template control) enthielten nur die QS-Bande, die stabil dargestellt wurde. Das Kit wird momentan nur in einer Abpackung von 50 Reaktionen (bzw. 10 Reaktionen der PCR 1 zum Kennenlernen) angeboten. Somit sollte beim Kunden in der Regel ein 20facher Einfrier- und Auftauzyklus nicht überschritten werden. Dennoch erfolgt die Kennzeichnung, dass wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermieden werden soll. Dem Kunden wird ggf. die Aliquotierung der Reagenzien empfohlen.

B Leistungsbewertungsprüfung gemäß § 24 MPG (Medizinproduktegesetz)

B a) Rahmenbedingungen

Es wurde eine Leistungsbewertungsprüfung nach den §§ 20 bis 24 Medizinproduktegesetz (DE) durchgeführt. Die Befreiung von der Genehmigungspflicht für Medizinprodukte mit geringem Sicherheitsrisiko gemäß § 7 Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten wurde vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte erteilt. Ein zustimmendes Votum der zuständigen Ethikkommission und schriftliche Patienteneinverständniserklärungen lagen vor.

B b) Methodik

B b) a) Probennahme und Versand

Die Probenahme stellt einen kritischen Schritt dar. Es muss davon ausgegangen werden, dass das Untersuchungsgut nicht homogen mit Pilzelementen durchsetzt ist.

Die Probenahme wurde durch geschultes Klinikpersonal gemäß Standardverfahren der Klinik durchgeführt. Vor der Entnahme von Hautschuppen, Nagelspänen und Haarschäften wurden die Entnahmestellen

mittels 70 %igem Ethanol desinfiziert. Als Tupfer für die PCR-Analytik wurden sterile FLOQSwabs der Firma Copan aus Polyurethanschaum verwendet (bezogen über Mast Diagnostics, Reinfeld). Mit Hilfe dieser wurden auch Hautschuppen aus sterilen Petrischalen aufgenommen (Tupfer vorher mit sterilem Wasser benetzen) und vor dem Transport ins Untersuchungslabor in sterile Einmalreaktionsgefäße (1,5 ml) überführt.

Achtung: Bei Verwendung anderer Beprobungstupfer, insbesondere aus Zellstoff, war die DNA-Wiederfindung nach Extraktion schlechter!

B b) b) Nativpräparate

Nativpräparate zur Hellfeld-Mikroskopie wurden nach William und Jones [1] mit folgenden Modifikationen angefertigt. Das Material wurde auf einem Objektträger mit Chlorazol E Lösung (180 mg Chlorazol E, 10 ml Dimethylsulfoxid, 90 ml 7,5 %ige KOH; Chemikalien von Sigma-Aldrich GmbH, Freiburg) vollständig benetzt, mit einem Deckglas versehen und 10 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Anwesenheit von Pilzelementen mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht (400x, Axioskop 40, Zeiss, Jena).

B b) c) Pilzkultur

Die Primärkultur erfolgte als Stichkultur mit Sabouraud-Glucose-Agar mit Chloramphenicol (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) oder Sabouraud-Glucose-Agar mit Chloramphenicol und Cycloheximid (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Die Kulturen wurden bis zu 4 Wochen bei Raumtemperatur bebrütet und wöchentlich auf Wachstum kontrolliert. Bei Wachstum erfolgte eine kulturelle Differenzierung (siehe unten). Negative Befunde wurden nach 4 Wochen erstellt.

Zur Differenzierung von Dermatophyten und Schimmelpilzen wurde eine neue selektive Sabouraud-Glucose-Agarplatte mit Pilzmaterial der Primärkultur beimpft und mindestens eine Woche (bei langsamen Wachstum 2 Wochen) bei Raumtemperatur bebrütet. Anschließend wurden Nativpräparate der Pilzelemente mikroskopisch ausgewertet. Optional erfolgte eine weitere kulturelle Differenzierung mit D.T.M.-Agar (Dermatophyten-Test-Medium; Merck, Darmstadt) oder Harnstofftest (BBL Prepared Culture Medium; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) nach Angaben der Hersteller.

Zur Differenzierung von Hefen wurden CandidaSelect™ 4 (CE-IVD, Bio-Rad Laboratories GmbH, München), Reisagar (Merck, Darmstadt) und AuxaColor™ 2 Yeast Identification System (CE-IVD, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) nach Angaben der Hersteller verwendet.

B b) d) **DNA-Extraktion und Aufreinigung**

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) (siehe Gebrauchsanweisung) des Mentype[®] **Mycoderm**^{OS} **Lateral Flow** PCR-Amplifikationskits).

B b) e) **PCR**

Diese experimentellen Schritte für die Multiplex-PCR erfolgten wie in der Gebrauchsanleitung des Mentype[®] **Mycoderm**^{OS} **Lateral Flow** PCR-Amplifikationskits beschrieben.

B c) **Ergebnisse und Diskussion**

Es wurden 240 Patienten mit Haut-, Schleimhaut- und Nagelläsionen untersucht. Davon waren 34 bereits mit einem Antimykotikum anbehandelt. Die klinische Untersuchung der Patienten ergab 82 Mykosen (*Tinea*) und 48 Onychomykosen. 272 Befunde waren ohne Mykoseverdacht, davon waren 7 bereits mit einem Antimykotikum anbehandelt.

Entsprechend der klinischen Befundung wurden 137 Nagelspäne, 175 Hautschuppen und 90 direkte Tupferabstriche aufgearbeitet (Summe 402), wobei Patienten mit mehreren unterschiedlichen betroffenen Hautpartien entsprechend mehrfach beprobt wurden.

Von den 402 Proben wurden 106 (26,4 %) mikroskopisch, 91 (22,6 %) kulturell, 132 (32,8 %) mikroskopisch und/oder kulturell und 144 (35,8 %) in der PCR positiv bewertet. Die Übereinstimmung der Untersuchungsmethoden ist nachfolgend in Tabelle 1 zusammengefasst. Die mikroskopisch positiven Befunde konnten zu 61,3 % durch Kultur und zu 100 % durch PCR bestätigt werden. Bei positiven Kulturen lag zu 71,4 % eine positive Mikroskopie vor, während 96,7 % mittels PCR bestätigt werden konnten.

Die spezifischen Herausforderungen bei der Bewertung von PCR-Tests für die Diagnose von Dermatophyten wurden in der Literatur vor kurzem nochmals referiert [2]. Insbesondere ist die Definition eines Vergleichsstandards schwierig, da die Mikroskopie und die Kultur nur mit Sensitivitäten von 50 - 80 % sowie großer Varianz zwischen verschiedenen Laboren beschrieben sind [3, 4]. Kondori *et al.* [5] haben deshalb vorgeschlagen, alle Proben, die mikroskopisch und/oder kulturell positiv sind, als richtig positiv zu betrachten. In Tabelle 2 sind die diagnostischen Werte basierend auf dieser Definition des Referenzstandards zusammengefasst.

Tab. 1: Übereinstimmung der Untersuchungsmethoden

Kombinierte Aussage der diagnostischen Methoden			Ergebnisse	
Mikroskopie	Kultur	PCR	Anzahl	%
-	-	-	255	63,4
+	+	+	65	16,2
+	+	-	0	0,0
-	+	+	23	5,7
+	-	+	41	10,2
-	+	-	3	0,7
+	-	-	0	0,0
-	-	+	15	3,7

Tab. 2: Diagnostische Werte für den PCR-Nachweis von Dermatophyten im Vergleich zur Mikroskopie und/oder Kultur als Referenzmethode

		Mikroskopie und/oder Kultur			Summe	
		positiv	negativ			
PCR	positiv	129	15	144	89,6	PPV [%]
	negativ	3	255	258	98,8	NPV [%]
	Summe	132	270	402		
		97,7	94,4			
		DSE [%]	DSP [%]			

DSE, diagnostische Sensitivität; DSP, diagnostische Spezifität;
 PPV, positiver Vorhersagewert, NPV, negativer Vorhersagewert.

B d) Referenzen

- [1] **William A, Burke WA, Jones BE.** A simple stain for rapid office diagnosis of fungus infections. *Archives of Dermatol* 1984; 120: 1519-20.
- [2] **Gräser Y, Czaika V, Ohst T.** Diagnostic PCR of dermatophytes - an overview. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012; 10: 721-5.
- [3] **Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T.** Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 511-8.
- [4] **Summerbell RC, Cooper E, Bunn U, Jamieson F, Gupta AK.** Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. *Med Mycol* 2005; 43: 39-59.
- [5] **Kondori N, Abrahamsson AL, Ataollahy N, Wenneras C.** Comparison of a new commercial test, Dermatophyte-PCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens. *Med Mycol* 2010; 48: 1005-8.

Anlage 1: Verwendete Referenzstämme und ihre Reaktivität in der Multiplex-PCR 1, 2 und 3. * CBS, **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Utrecht, NL. DSM, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig. ATCC, American Type Culture Collection über LGC Standards GmbH, Wesel. M, Dr. Mauersberger, Dresden. N, Prof. Nenoff, Mölbis.

Art	Stamm*	Multiplex PCR
<i>Alternaria mali</i>	CBS 106.24	-
<i>Arthroderma benhamiae</i>	CBS 280.83	1 + 2
<i>Arthroderma insingulare</i>	CBS 521.71	1
<i>Arthroderma lenticulare</i>	CBS 307.65	1
<i>Arthroderma quadrifidum</i>	CBS 613.74	1
<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	CBS 646.73	1 + 2
<i>Aspergillus flavus</i>	N 203979/2008	-
<i>Aspergillus flavus</i>	M S06	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	N 120293/2006	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	M S07	-
<i>Aspergillus niger</i>	N 200939/2009	-
<i>Aspergillus niger</i>	M S05	-
<i>Aspergillus niger</i>	N 201250/2009	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	CBS 583.65	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	DSM 1943	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	M S12	-
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10	-
<i>Candida albicans</i>	N 08/2008 Strain C	1
<i>Candida albicans</i>	N 107441/2009	1
<i>Candida albicans</i>	DSM 1386	1
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 90030	1
<i>Candida glabrata</i>	N 2005-5	1
<i>Candida glabrata</i>	DSM 6425	1
<i>Candida guilliermondii</i>	N 490-1/2009-2	1
<i>Candida guilliermondii</i>	DSM 6381	1
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	1
<i>Candida krusei</i>	N 490-1/2007-3	1
<i>Candida krusei</i>	DSM 3433	1
<i>Candida parapsilosis</i>	N 107206/2009	1
<i>Candida parapsilosis</i>	N 107577/2009	1
<i>Candida parapsilosis</i>	DSM 5784	1
<i>Candida tropicalis</i>	N 102744/2008	1
<i>Candida tropicalis</i>	N 2/2008-3	1
<i>Candida tropicalis</i>	DSM 11953	1

Art	Stamm*	Multiplex PCR
<i>Alternaria mali</i>	CBS 106.24	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 24916	-
<i>Epidermophyton floccosum</i>	N 114327/2007	1 + 3
<i>Epidermophyton floccosum</i>	N 204179/2008	1 + 3
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CBS 358.93	1 + 3
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	DSM 2018	-
<i>Fusarium solani</i>	DSM 62416	-
<i>Malassezia furfur</i>	CBS 1878	-
<i>Malassezia globosa</i>	CBS 7966	-
<i>Malassezia restricta</i>	CBS 7877	-
<i>Microsporium canis</i>	CBS 282.63	1 + 3
<i>Microsporium canis</i>	N 203213/2007	1 + 3
<i>Microsporium canis</i>	CBS 190.57	1 + 3
<i>Nannizzia gypsea</i>	N 203237/2007	1 + 3
<i>Nannizzia gypsea</i>	N 203353/2002	1 + 3
<i>Nannizzia gypsea</i>	CBS 258.61	1 + 3
<i>Microsporium audouinii</i>	CBS 280.63	1 + 3
<i>Microsporium audouinii</i>	CBS 344.50	1 + 3
<i>Microsporium audouinii</i>	CBS 119449	1 + 3
<i>Microsporium ferrugineum</i>	CBS 457.80	1
<i>Microsporium ferrugineum</i>	CBS 426.63	1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DSM 848	-
<i>Penicillium griseovulum</i>	DSM 896	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	DSM 70398	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DSM 70404	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSM 70449	1
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	N 11/06	1
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	N 2002-C	1
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	DSM 9122	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20231	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSM 20044	-
<i>Trichophyton interdigitale</i>	N 200454/2009	1 + 2
<i>Trichophyton interdigitale</i>	N 201029/2008	1 + 2
<i>Trichophyton interdigitale</i>	CBS 558.66	1 + 2
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CBS 106.67	1 + 2
<i>Trichophyton rubrum</i>	N 107241/2009	1
<i>Trichophyton rubrum</i>	N 107246/2009	1
<i>Trichophyton rubrum</i>	CBS 392.58	1
<i>Trichophyton tonsurans</i>	CBS 120.65	1 + 2

Art	Stamm*	Multiplex PCR
<i>Alternaria mali</i>	CBS 106.24	-
<i>Trichophyton tonsurans</i>	CBS 483.76	1 + 2
<i>Trichophyton tonsurans</i>	CBS 496.48	1 + 2
<i>Trichophyton verrucosum</i>	CBS 134.66	1 + 2
<i>Trichophyton verrucosum</i>	CBS 554.84	1 + 2
<i>Trichophyton verrucosum</i>	CBS 564.50	1 + 2
<i>Trichophyton violaceum</i>	CBS 319.31	1 + 2
<i>Trichophyton violaceum</i>	CBS 730.88	1 + 2
<i>Trichosporon cutaneum</i>	DSM 70675	-
<i>Trichosporon cutaneum</i>	DSM 70698	-