

# Mentype<sup>®</sup> MycoDerm<sup>QS</sup>

## Gebrauchsanweisung

**Der schnelle und sichere Erregernachweis  
bei Verdacht auf Dermatomykosen**

Für In-vitro-diagnostische Untersuchungen



50



MDAIFU01v11de

8. Juli 2019



45-21310-0050



Biotype GmbH  
Moritzburger Weg 67  
D-01109 Dresden  
Germany

Made in Germany

Die Biotype 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](http://www.biotype.de)

### **Warenzeichen und Patente**

Mentype® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Biotype GmbH.

Ficoll® ist ein eingetragenes Warenzeichen der GE Healthcare Bio-Sciences AB.

GelRed™ ist ein eingetragenes Warenzeichen der Biotium Inc.

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 GmbH, alle Rechte vorbehalten.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Beschreibung des Mentype® MycoDerm<sup>OS</sup></b> .....	<b>6</b>
<b>2. Übersicht der notwendigen Arbeitsschritte</b> .....	<b>10</b>
<b>3. Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und zusätzlich benötigte Reagenzien</b> .....	<b>11</b>
<b>4. Wichtige Hinweise</b> .....	<b>12</b>
4.1 Wichtige Hinweise vor Präparationsbeginn.....	12
4.2 Probennahme.....	13
<b>5. Protokolle</b> .....	<b>14</b>
<b>5.1 Lyse der Patientenproben mit anschließender DNA-Isolierung unter Verwendung von DNA-freien 1,5 ml Standardzentrifugenröhrchen</b> .....	<b>14</b>
5.1.1 Lyse von Haut-, Haar- und Nagelspäneproben mit anschließender DNA-Isolierung.....	14
5.1.2 Lyse ganzer Nägel mit anschließender DNA-Isolierung.....	16
<b>5.2 PCR-Amplifikation</b> .....	<b>17</b>
5.2.1 Ansatz der Mastermixe PCR 1 und PCR 2.....	17
5.2.2 Positivkontrollen.....	18
5.2.3 Negativkontrollen.....	18
5.2.4 PCR-Amplifikationsparameter.....	19
<b>5.3 Agarosegelelektrophorese</b> .....	<b>19</b>
5.3.1 Probenvorbereitung.....	20
5.3.2 Elektrophorese.....	20
5.3.3 DNA-Färbung mit GelRed <sup>TM</sup> und Geldokumentation.....	20
<b>5.4 Auswertung</b> .....	<b>21</b>
<b>6. Alternativ-Protokolle für die Lyse der Patientenproben mit anschließender DNA-Isolierung</b> .....	<b>24</b>
<b>6.1 Lyse der Patientenproben mit anschließender DNA-Isolierung unter Verwendung von Samplettype i-sep® SQ</b> .....	<b>24</b>
6.1.1 Lyse von Haut-, Haar- und Nagelspäneproben mit anschließender DNA-Isolierung (Samplettype i-sep® SQ).....	24
6.1.2 Lyse ganzer Nägel mit anschließender DNA-Isolierung unter Verwendung von Samplettype i-sep® SQ.....	26
<b>7. Troubleshooting</b> .....	<b>27</b>
<b>7.1 PCR-Amplifikation</b> .....	<b>27</b>
<b>7.2 Gelelektrophorese</b> .....	<b>28</b>
<b>7.3 Fehler in der Gelfärbung</b> .....	<b>29</b>
<b>8. Referenzen</b> .....	<b>30</b>
<b>9. Symbole</b> .....	<b>31</b>

<b>A Analytische Validierung</b> .....	<b>32</b>
A a) Prüfmittel.....	32
A b) Testung der analytischen Spezifität .....	32
A c) Testung der analytischen Sensitivität .....	32
A d) Testung verschiedener DNA-Mischproben .....	33
A e) Testung verschiedener Annealingtemperaturen bei der PCR .....	33
A f) Testung verschiedener PCR-Thermocycler.....	33
A g) Testung der Stabilität nach Anbruch.....	34
<b>B Leistungsbewertungsprüfung gemäß § 24 MPG (Medizinproduktegesetz)</b> .....	<b>34</b>
B a) Rahmenbedingungen.....	34
B b) Methodik .....	34
B b) a) Probennahme und Versand.....	34
B b) b) Nativpräparate .....	35
B b) c) Pilzkultur .....	35
B b) d) DNA-Extraktion und Aufreinigung .....	36
B b) e) PCR, Agarose-Gelelektrophorese und Geldokumentation .....	36
B c) Ergebnisse .....	36
B d) Referenzen.....	39

## 1. Beschreibung des Mentype® MycoDerm<sup>QS</sup>

Das Mentype® **MycoDerm**<sup>QS</sup> PCR-Amplifikationskit erlaubt die effiziente Diagnostik von Dermatomykosen (Hautpilzinfektionen) im Routinelabor. Diese molekularbiologische Diagnostik basiert auf der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen, die in sogenannten Markergenbereichen der jeweiligen Dermatomykoseerreger liegen und eine artspezifische Unterscheidung zulassen. Die Detektion erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese mit anschließender Geldokumentation.

Das Assay wurde so konzipiert, dass eine leicht handhabbare, routinefähige und sichere Diagnostik innerhalb von 24 Stunden möglich ist. Dies steht im Gegensatz zu der sehr zeitaufwendigen klassischen Diagnostik von Dermatomykosen, die umfangreiche, bis zu vier Wochen andauernde Kultivierungen benötigt. Bedingt durch das Risiko von Probenkontaminationen (z. B. Anflugkeime) oder einer Unterdrückung des Hauptkeims durch einen schneller wachsenden Sekundärkeim in Mischproben erhöht die Kultivierung außerdem die Gefahr von Fehlinterpretationen. Diese potentiellen Fehlerquellen können durch die Anwendung des Mentype® **MycoDerm**<sup>QS</sup> Assays ausgeschlossen werden. Außerdem weist der molekulargenetische Test auch totes Erregermaterial nach und ist somit auch bestens für die Diagnostik von bereits anbehandelten Patienten geeignet.

Das Assay beinhaltet optimierte Reagenzien für den art- bzw. gattungsspezifischen Nachweis von 23 in Europa relevanten Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilzen [1]. Die Auswahl und Abgrenzung der Erreger (siehe Tabelle 1) wurde in Absprache mit klinischen Experten getroffen und trägt sowohl zur raschen Abklärung der Krankheitsursache als auch zur situationsgerechten Therapieentscheidung bei. Insbesondere ist dies vor dem Hintergrund zunehmender Antimykotikaresistenzen von großer Bedeutung [2, 3]. Gemäß den Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik (MiQ) der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) [4] enthält der Mentype® **MycoDerm**<sup>QS</sup> eine interne PCR-Amplifikationskontrolle (Quality Sensor, QS). Im Falle eines negativen Erregernachweises (fehlendes Erreger-Amplifikat) dient diese als Bestätigung einer erfolgreich durchgeführten PCR.

Zur raschen und sicheren Zuordnung der PCR-Produkte ist dem Kit eine sogenannte Referenzleiter beigefügt. Dabei handelt es sich um ein Gemisch von erregerspezifischen Amplifikationsprodukten für die unkomplizierte Zuordnung der Erregeramplifikate.

**Tabelle 1:** Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilzerreger, nachweisbar in der kombinierten Multiplex-PCR des Mentype® **MycoDerm**<sup>QS</sup> Assays.

Gattung	Art	Primertyp	gattungsspezifisch erfasste Arten
<i>Epidermophyton</i>	<i>floccosum</i>	artspezifisch	
<i>Microsporum</i>	<i>spp.</i>	clusterspezifisch	<i>Microsporum canis</i> <i>Microsporum ferrugineum</i> ( <i>Microsporum audouinii</i> ) <sup>(1)</sup>
<i>Nannizzia</i>	<i>gypseae</i> <sup>(2)</sup>	artspezifisch	
<i>Trichophyton</i>	<i>rubrum</i>	artspezifisch	
<i>Trichophyton</i>	<i>interdigitale</i>	artspezifisch	
<i>Trichophyton</i>	<i>spp.</i>	gattungsspezifisch	<i>T. rubrum</i> <i>T. interdigitale</i> <i>T. tonsurans</i> <i>T. violaceum</i> <i>T. verrucosum</i> <i>T. benhamiae</i> <sup>(3)</sup>
<i>Candida</i>	<i>spp.</i>	gattungsspezifisch	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> ( <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> ) <i>C. guilliermondii</i> ( <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ) <i>C. parapsilosis</i>
<i>Trichosporon</i>	<i>cutaneum</i>	artspezifisch	
<i>Scopulariopsis</i>	<i>brevicaulis</i>	artspezifisch	
<i>Aspergillus</i>	<i>spp.</i>	gattungsspezifisch	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. versicolor</i>

<sup>(1)</sup> *Microsporum audouinii* zeigt eine Kreuzreaktivität ab 250 pg genomischer DNA. Ein Nachweis aus klinischem Material kann deshalb nicht garantiert werden.

<sup>(2-3)</sup> Vormalis: <sup>2</sup>*Microsporum gypseum*, <sup>3</sup>*T. Species von A. benhamiae* [10]

## Kit-Inhalt

Mentype® <b>MycoDerm</b> <sup>OS</sup> PCR-Amplifikationskit	
Bestellnummer 45-21310-0050	
Anzahl der Reaktionen 50	
Nukleasefreies Wasser / Nuclease-Free Water	2 x 1,5 ml
Reaktionsmix / Reaction Mix <b>D</b> (REM D)	1 x 500 µl
Multi Taq2 DNA-Polymerase /	1 x 40 µl
Multi Taq2 DNA-Polymerase	1 x 10 µl
Primergemisch / Primermix <b>PCR 1</b>	50 µl
Kontroll-DNA / Control-DNA <b>PCR 1</b> (2 ng/µl) ( <i>Microsporum gypseum</i> )	10 µl
Quality Sensor (QS) <b>PCR 1</b>	50 µl
Referenzleiter / Reference Ladder <b>PCR 1</b>	80 µl
Primergemisch / Primermix <b>PCR 2</b>	50 µl
Kontroll-DNA / Control-DNA <b>PCR 2</b> (2 ng/µl) ( <i>Trichophyton rubrum</i> )	10 µl
Quality Sensor (QS) <b>PCR 2</b>	50 µl
Referenzleiter / Reference Ladder <b>PCR 2</b>	80 µl
Puffer <b>L</b> / Buffer <b>L</b> (conc.)*	3 x 0,6 ml
Puffer <b>N</b> / Buffer <b>N</b>	3 x 1,5 ml

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

## Lagerung

Die Lagerung der PCR-Reagenzien (REM D, Multi Taq2 DNA-Polymerase, Primergemische, Nukleasefreies Wasser) sowie der Standards (Referenzleiter, Kontroll-DNA und Quality Sensor (QS)) sollte bei -25°C bis -15°C erfolgen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Die Puffer **L** und **N** können bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die Referenzleiter sowie die Kontroll-DNA der **PCR 1** und **PCR 2** müssen unbedingt getrennt von den PCR-Reagenzien gelagert werden (Trennung der Bereiche Prä- und Post-PCR zur Vermeidung von Kontaminationen). Die Haltbarkeit des Testkits ist auf dem Verpackungsetikett angegeben.

## Qualitätssicherung

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



## Anwendungsgebiet

Das Mentype® **MycoDerm**<sup>QS</sup> 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 Nagelmaterial und Hautschuppen, aber auch Haarstümpfe oder Abstriche.

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 unter DE/CA83/2012-39 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 Probenpräparationsverfahrens in Verbindung mit einem diagnostischen Test erzielt wurden, sind unter Berücksichtigung anderer klinischer Befunde oder Laborergebnisse auszuwerten.

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 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.

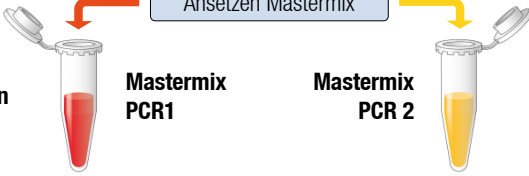
Folgende potenziell gefährliche Substanzen sind in diesem Testkit enthalten:

Kitbestandteil	Chemikalie	Anteil	Gefährdungen (H) und Vorsichtsmaßnahmen (P)
Puffer <b>L</b> / Buffer <b>L</b> (conc.)	KOH	10 %	<b>GHS05: Gefahr Ätzwirkung</b> // H302 (Gesundheitsschädlich beim Verschlucken), H314 (verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden), <b>GHS07 Achtung!</b> // H290 (kann gegenüber Metallen korrosiv sein)  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)

## Haftungsausschluss

Wir weisen darauf hin, dass eine Probenverwechslung und/oder Kontamination zu einer falschen Diagnose führen kann. Eine auf falschen Ergebnissen basierende systemische Behandlung kann unter Umständen zu einer lebensbedrohlichen Schädigung führen. Die Biotype GmbH übernimmt keine Haftung.

## 2. Übersicht der notwendigen Arbeitsschritte

Arbeitszeit*	Arbeitsablauf	Wartezeit
15 min	Proben-Lyse	≥ 12 h
1,5 h	DNA-Extraktion	
	Ansetzen Mastermix	
45 min	 Mastermix PCR1      Mastermix PCR 2	
	Multiplex-PCR	2 – 2,5 h
15 min	Agarose-Gel gießen	
	Agarose-Gel aushärten	30 min
30 min	Agarose-Gel beladen	
	Gel-Elektrophorese	1 h
2 min	Gel-Red™ Färbung	1 h
10 min	Auswertung	
<b>ca. 3,5 h</b>		<b>ca. 17 h</b>

**Abbildung 1:** Von der Probe bis zum Nachweis – Diagnostik bei Verdacht auf Dermatomykosen mit Hilfe des Mentype® MycoDerm<sup>DS</sup> PCR-Amplifikationskits.

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

### 3. Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und zusätzlich benötigte Reagenzien

Laborschutzkleidung (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#

Benötigte Reagenzien:

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

Für die Gelelektrophorese:

- Pipetten\* und Pipettenspitzen
- Einmalhandschuhe (puderfrei)
- Heizrührer bzw. Mikrowelle
- Elektrophoresesystem (wir empfehlen das iMupid Mini Agarose Gel Electrophoresis System von Helixx Technologies Inc.)#
- Färbeschale
- Geldokumentation (z. B. BioVision 3000 von Vilber Lourmat Deutschland GmbH)#
- Densitometrische Auswertesoftware (z. B. Bio-1D advanced von Vilber Lourmat Deutschland GmbH)#

\*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.

Weiterhin benötigte Reagenzien:

Reagenz	Anbieter <sup>#</sup>	Bestellnummer
6x Gelladepuffer für die DNA-Gelelektrophorese mit Bromphenolblau und Ficol <sup>®</sup> 400	Appllichem GmbH	A3144,0011
GelRed <sup>™</sup> (DNA-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff) für die DNA-Gelelektrophorese	Biotium Inc.	41003
Agarose für die DNA-Gelelektrophorese	PeqLab Biotechnologie GmbH	35-1030
TBE-Puffer für die DNA-Gelelektrophorese	Appllichem GmbH	A0972,5000PE
1x TE-Puffer	Appllichem GmbH	A2575,1000
1 M Natriumchlorid-Lösung	Appllichem GmbH	A3511,1000
Wasser für die Molekularbiologie (Nuklease-frei)	Appllichem GmbH	A7398,1000

<sup>#</sup>Dies ist keine vollständige Lieferantenliste; weitere Laborbedarf-Vertreiber sind nicht aufgeführt.

## 4. Wichtige Hinweise

### 4.1 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 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 sie nicht mit Probenmaterial kontaminiert sind (ggf. wechseln).
- Entsorgen Sie die Handschuhe, falls sie kontaminiert wurden.
- Öffnen Sie immer nur ein Gefäß, 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 Personal verwendet werden, das in Verfahren der In-vitro-Labor Diagnostik und der PCR-Methodik geschult ist.

## 4.2 Probennahme

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 empfehlen wir die Probenahme- und Prozessiergefäße Sampletype **i-sep**<sup>®</sup> SQ (Biotype GmbH; Bestellnummer 61-00201-0050 bzw. 63-00201-0050). Hierbei wird die gewonnene Patientenprobe mit dem mit sterilen Wasser angefeuchteten Tupfer aufgenommen und in den Filtereinsatz des Kombigefäßes überführt.

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

## 5. Protokolle

Für eine effektive Durchführung der Lyse und zur Gewinnung eines partikelfreien DNA Lysates empfehlen wir die Verwendung von Sampletype **i-sep**<sup>®</sup> SQ Röhrchen. Die Protokolle hierzu sind im **Kapitel 6** zu finden.

Die Lyse der Patientenproben wird je nach Beschaffenheit in zwei unterschiedlichen Protokollen behandelt. So wird die Lyse von **Haut-, Haar- und Nagelspäneproben** unter **5.1.1** beschrieben, die Lyse **ganzer Nägel** unter **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-, Haar-, 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.

Abweichend davon sollte jedoch beim **Elutionsschritt das Volumen des Elutionspuffers** von zumeist 200 µl auf **50 µl** reduziert werden. Um einen optimalen Gewebeaufschluss zu gewährleisten, empfehlen wir generell die **Inkubation mit Proteinase K über Nacht** oder für mindestens 12 Stunden.

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

**Im Folgenden wird die Probenlyse und DNA-Isolierung unter Verwendung des Qiagen QIAamp<sup>®</sup> 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.

1. **200 µl Lysepuffer** (180 µl ATL\* + 20 µl Proteinase K) zum Probenmaterial in den 1,5 ml Standardzentrifugenröhrchen geben und mit dem Deckel verschließen.
2. Im Theroschüttler bei **56 °C** und **850 U/min** die Probe über Nacht oder für mindestens **12 Stunden** inkubieren.
3. Kondensropfen im Deckel durch Zentrifugieren für **1 min** bei **14.000 U/min** entfernen.

---

\*Puffer fällt bei niedrigen Temperaturen aus. Puffer durch kurzes Erhitzen vor Zugabe zur Probe wieder lösen.

4. **200 µl Puffer AL** zugeben, mit dem Deckel verschließen und mischen (**15 s** vortexen).
5. Im Thermoschüttler bei **70 °C** und **850 U/min** für **10 min** inkubieren.
6. Kondenstropfen im Deckel durch Zentrifugieren für **1 min** bei **14.000 U/min** entfernen.
7. **200 µl 99 % Ethanol** zugeben und **15 s** vortexen, danach kurz abzentrifugieren.
8. Den Überstand (**600 µl Lysat**) in das **QIAamp® Mini Kit Säulchen** transferieren und bei **14.000 U/min** für **1 min** zentrifugieren. Auffanggefäß mit Durchfluss verwerfen.
9. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein unbenutztes Auffanggefäß einstecken.
10. **500 µl Puffer AW1** zugeben und bei **8.000 U/min** für **1 min** zentrifugieren. Auffanggefäß mit Durchfluss verwerfen.
11. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein neues Auffanggefäß einstecken.
12. **500 µl Puffer AW2** zugeben und bei **14.000 U/min** für **3 min** zentrifugieren. Auffanggefäß mit Durchfluss verwerfen.
13. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein neues Auffanggefäß einstecken.
14. Wiederholung der Zentrifugation bei **14.000 U/min** für **1 min**.
15. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein frisches, DNA-freies 1,5 ml Standardzentrifugenröhrchen transferieren und das Auffanggefäß wegwerfen.
16. **50 µl Puffer AE** zugeben und für **1 min** bei **Raumtemperatur** inkubieren.
17. **Bei 8.000 U/min** für **1 min** zentrifugieren (QIAamp® Mini Kit Filtereinsatz wegwerfen).

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

### 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**<sup>QS</sup> 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 ersten kitspezifischen Puffer (**ATL**) des DNA-Isolierungskits.

1. **100 µl Puffer L** (Mentype® **MycoDerm**<sup>QS</sup>; auf Gebrauchskonzentration eingestellt; **Raumtemperatur**) zum Probenmaterial in das 1,5 ml Standardzentrifugenröhrchen geben und mit dem Deckel verschließen.
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 **14.000 U/min** entfernen.
4. **80 µl Puffer N** (Mentype® **MycoDerm**<sup>QS</sup>; **Raumtemperatur**) und **20 µl** der **Proteinase K** zugeben, mit dem Deckel verschließen und mischen (vortexen).

Die weitere DNA-Extraktion und -Aufreinigung erfolgt analog zum **Kapitel 5.1.1** mit dem **Arbeitsschritt 2** (Inkubation über Nacht).



## 5.2 PCR-Amplifikation

### 5.2.1 Ansatz der Mastermixe PCR 1 und PCR 2

Alle Reagenzien sollten so kurz wie möglich bei Raumtemperatur gehalten und nach der Verwendung sofort wieder bei -20 °C gelagert werden.

#### Der QS sollte zudem immer auf Eis pipettiert werden!

Vor der Verwendung sollten die Reagenzien gut gemischt (vortexen) und kurz zentrifugiert werden (10 s).

- Das empfohlene Probenvolumen von 4 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 Positiv- und Negativkontrolle jeweils für die **PCR 1** und **PCR 2**. Fügen Sie zu dieser Zahl ein oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierfehler zu kompensieren.
- **Der Quality Sensor PCR 2 muss vor der Präparation des Mastermixes immer frisch in 1x TE-Puffer verdünnt werden (Verdünnungsfaktor 1:200).** Von dieser Verdünnung wird im Anschluß 1 µl zum Mastermix zugegeben.

#### Mastermix PCR1

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

Komponente	Volumen
Nuclease-free Water	13,5 µl
Reaction Mix <b>D*</b>	5,0 µl
Primer Mix <b>PCR 1</b>	1,0 µl
Quality Sensor <b>PCR 1</b>	1,0 µl
Multi Taq2 DNA-Polymerase (hot start, 2.5 U/µl)	0,5 µl
Volumen des Mastermixes	21,0 µl

\*enthält Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, BSA

#### Mastermix PCR2

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

Komponente	Volumen
Nuclease-free Water	13,5 µl
Reaction Mix <b>D*</b>	5,0 µl
Primer Mix <b>PCR 2</b>	1,0 µl
Quality Sensor <b>PCR 2 (1:200)</b>	1,0 µl
Multi Taq2 DNA-Polymerase (hot start, 2.5 U/µl)	0,5 µl
Volumen des Mastermixes	21,0 µl

\*enthält Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, BSA

### Hinweise:

Die **PCR 1** zeigt ideale Ergebnisse bei Einsatz von 50 pg bis 250 pg Erreger-DNA und die **PCR 2** bei 10 pg bis 100 pg Erreger-DNA. Bei Referenzmaterial und Isolaten von Kulturplatten ist der Einsatz von 1 µl DNA-Isolat (verdünnen auf 250 bzw. 100 pg/µl) meist völlig ausreichend.

Bei Patientenmaterial empfehlen wir das optimale Volumen von 4 µl DNA-Isolat zu verwenden. DNA-Isolate aus Nagelproben von anbehandelten Patienten empfehlen wir 1:4 verdünnt mit TE-Puffer in die 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. Die Gesamt-DNA pro PCR-Ansatz (humane DNA und ggf. Erreger-DNA) sollte 200 ng nicht übersteigen.

Das Primergemisch ist so eingestellt, dass bei **40 PCR-Zyklen** in einem Reaktionsvolumen von 25 µl ausreichend DNA für sichtbare Gelbanden amplifiziert wird.

### 5.2.2 Positivkontrollen

Um die maximale Sensitivität des Assays zu gewährleisten, wird das Mitführen einer niedrig konzentrierten Positivkontrolle in beiden PCR-Ansätzen (**PCR 1** und **PCR 2**) empfohlen.

- Verdünnen Sie hierfür die **Kontroll-DNA PCR 1** mit Verdünnungsfaktor **1:160 in 1x TE-Puffer**
- sowie die **Kontroll-DNA PCR 2** mit Verdünnungsfaktor **1:400 in 1x TE-Puffer**.
- Pipettieren Sie **4 µl der verdünnten Kontroll-DNA** anstelle der Template-DNA in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten PCR-Mastermix.

Die Agarosegelelektrophorese ist optimal abgelaufen (Auftrennung, Färbung), wenn das resultierende PCR-Produkt anschließend sicher detektiert werden kann.

### 5.2.3 Negativkontrollen

Als Negativkontrollen pipettieren Sie Nuklease-freies Wasser an Stelle der Template-DNA in jeweils ein Reaktionsgefäß mit dem vorgelegten PCR-Mastermix für **PCR 1** bzw. **PCR 2**. Hier sollte nach der Amplifikation neben der QS-Bande kein weiteres Amplifikat detektiert werden.

### 5.2.4 PCR-Amplifikationsparameter

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

Temperatur	Zeit	
94 °C	4 min	(hot start für Aktivierung der Multi Taq2 DNA-Polymerase)
94 °C	30 s	
62 °C	60 s	<b>5 Zyklen</b>
72 °C	90 s	
94 °C	30 s	
60 °C	60 s	<b>35 Zyklen</b>
72 °C	90 s	
10 °C	∞	

Zur Durchführung der PCR-Amplifikation sollte immer ein Thermocycler mit einer Heizrate von mind. **4 - 6 °C/s** zum Einsatz kommen. Die Validierung des Testkits wurde mit dem Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf AG) sowie dem Biometra T1 (Biometra GmbH) durchgeführt.

### 5.3 Agarosegelelektrophorese

Prinzipiell sind für die Auswertung der Multiplex-PCR verschiedene Geräte für Gelelektrophorese und -dokumentation geeignet.

Entscheidend für die Auflösung der erregerspezifischen Banden sind die Qualität und **Konzentration der Agarose (2 %)**, die **Dicke des Agarosegels (4 - 5 mm)** sowie die **Trennstrecke (min. 5,5 cm)**.

Für die Sensitivität sind die Schichtdicke des Gels, die DNA-Färbetechnik und der optische Aufbau des verwendeten Geldokumentationssystems entscheidend.

Die dem Kit beiliegenden Referenzleitern bzw. eine Kontroll-PCR unter Verwendung der ebenfalls beiliegenden Positivkontrollen können zur Kalibrierung hauseigener Systeme genutzt werden. Grundlagen der Agarosegelelektrophorese entnehmen Sie Sambrook et al. 1989 [5] bzw. folgen Sie den Anweisungen der Gerätehersteller.

Die Validierung des Testkits wurde mit dem Elektrophoresesystem iMupid Mini Agarose Gel Electrophoresis System (Helix Technologies Inc.) in Kombination mit der Geldokumentation BioVision 3000 (Vilber Lourmat Deutschland GmbH) durchgeführt. Letztere verfügt über einen UV-Leuchttisch mit 312 nm Anregungswellenlänge und einem Emissionsfilter von 590 nm. Die Kamera wurde mit Blende 2,8 und Belichtungszeit 1 - 3 s eingestellt. Die Färbung erfolgte mit dem DNA-Farbstoff GelRed™ (Biotium Inc). Die Auswertung der Gelbilder erfolgte mit der Software Bio-1D advanced (Vilber Lourmat Deutschland GmbH).

### 5.3.1 Probenvorbereitung

Für ein Auftragsvolumen von 12 µl pro Geltasche werden:

- 10 µl PCR-Amplifikat und 2 µl 6x Gelladepuffer (Bromphenolblau und Ficoll® 400) gut gemischt und das gesamte Volumen aufgetragen.

Für die Verwendung der Referenzleiter werden:

- 5 µl Referenzleiter und 5 µl 6x Gelladepuffer gemischt und das gesamte Volumen aufgetragen.

Bei Gelen bis zu 12 Proben empfehlen wir zwei Referenzleitern pro Gel (beide Außentaschen). Bei größeren Gelen mit mehr als 12 Proben sollte zusätzlich eine Tasche in der Mitte des Gels mit der Referenzleiter beladen werden. Dies erleichtert die spätere Zuordnung der Produktbänder.

### 5.3.2 Elektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung wird ein **2 %iges Agarosegel in 1x TBE-Puffer** benötigt (z. B. peqGOLD Universal-Agarose, PeqLab Biotechnologie GmbH oder vergleichbare Qualität). Die **Geldicke** sollte **maximal 5 mm** betragen.

Gemäß Gerätehersteller wird die **Elektrophorese** bei **6 Volt/cm** bezogen auf den Elektrodenabstand und bei Raumtemperatur (maximal 26 °C) durchgeführt.

Die **Trennstrecke**, das heißt die Entfernung der Lauffront von den Auftragstaschen, sollte **mindestens 5,5 cm** betragen. Diese wird anhand des Bromphenolblau im Ladepuffer ersichtlich (Farbstoff zur Verfolgung der Laufweite).

### 5.3.3 DNA-Färbung mit GelRed™ und Geldokumentation

Zur DNA-Färbung **muss** der Fluoreszenzfarbstoff **GelRed™** (Biotium Inc.) verwendet werden, der bei der Validierung des Testkits eingesetzt wurde. Der Farbstoff besitzt vergleichbare spektrale Eigenschaften wie Ethidiumbromid, ist jedoch im Gegensatz dazu in der DNA-Färbung empfindlicher und im Hinblick auf Gesundheit und damit Arbeits- und Umweltschutzmaßnahmen unbedenklich [6].

- Für ein **Gelfärbebad** von **50 ml** (3fach konzentriert) werden **15 µl GelRed™** (Nucleic Acid Gel Stain 10.000x in Water (Biotium Inc.)) mit **45 ml destilliertem Wasser** und **5 ml 1 M NaCl-Lösung** verdünnt.

Das Gel muss während des Färbens komplett vom Färbebad bedeckt sein.

Um eine hohe Sensitivität zu gewährleisten, sollte das Bad immer frisch hergestellt und für maximal 5 Gele oder eine Woche benutzt werden. Farbstoff und Färbebad müssen stets vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

- Die Färbedauer sollte **ca. 50 min** betragen (abhängig vom Alter des Färbebads und Anzahl der bereits gefärbten Gele) und immer lichtgeschützt erfolgen.

**Hinweis:** Aufgrund des Interkalierungsverhaltens des Farbstoffs ist unbedingt davon abzuraten, den Farbstoff während des Gelgießens zuzusetzen, da dies sonst zu verändertem Laufverhalten auf Grund von Ladungsänderungen der doppelsträngigen DNA führt.

## 5.4 Auswertung

Grundsätzlich empfehlen wir eine Software zur automatischen Auswertung der Agarosegelbilder. Diese werden von der jeweiligen Steuerungssoftware der Geldokumentationssysteme im Windows Bitmap-Format (bmp) oder Tagged Image File Format (Tiff) abgespeichert.

Sie können außerdem anschließend mittels der Software Bio-1D advanced (Vilber Lourmat Deutschland GmbH) unter Beachtung der Herstellerangaben eine automatische Bandendetektion und Fragmentlängenanalyse vornehmen. Die dafür benötigten Fragmentlängen der Referenzleitern der **PCR 1** bzw. **PCR 2** können Sie der Tabelle 2 entnehmen.

Durch die Auswertung mit automatischer Zuordnung der Gelbanden wird eine genaue und zuverlässige Unterscheidung der einzelnen Organismen gewährleistet.

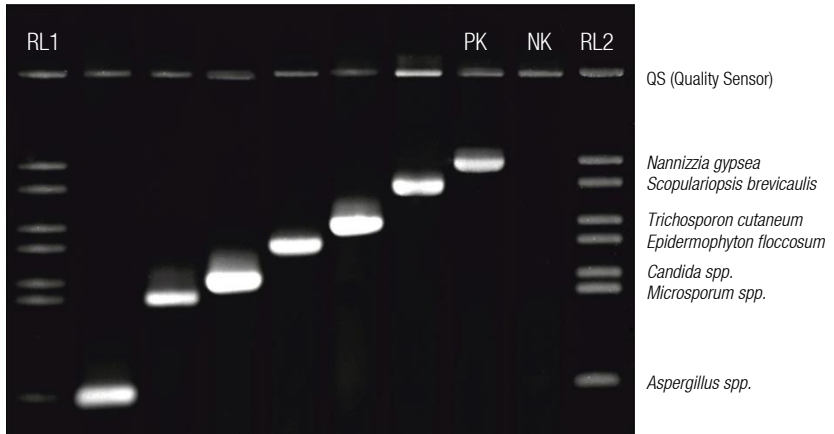
Ein erfolgreiches Experiment zeichnet sich durch eine sichtbare Bande des Quality Sensors (QS) in mindestens allen negativen Reaktionen aus\*.

Die Negativkontrolle sollte keine zusätzlichen Banden aufweisen. Die Sensitivität des Tests ist gewährleistet, wenn eine Bande der Positivkontrolle sicher detektiert werden kann (siehe Positivkontrollen Kap. 5.2.2).

---

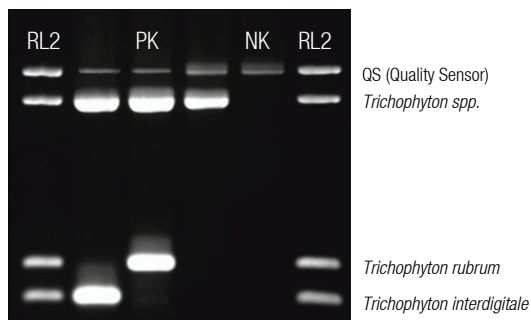
\*Bei hohen Konzentrationen erregerspezifischer DNA und deren Amplifikaten kann die QS-Bande teilweise unterdrückt werden.

Abbildung 2 zeigt beispielhaft ein Agarosegel mit den erregerspezifischen Amplifikaten des art- und gattungsspezifischen Nachweises der Dermatophyten, die in der **PCR 1** erfasst werden.



**Abbildung 2:** Gelelektrophorese **PCR 1:** 2 %iges Agarosegel; Trennstrecke: 7,0 cm; Elektrophoresebedingungen: 60 min bei 6 V/cm, Detektion: GelRed™ (Biotium, Inc.). RL1: Referenzleiter 1; PK: Positiv-Kontrolle; NK: Negativ-Kontrolle

Abbildung 3 zeigt beispielhaft ein Agarosegel mit den erregerspezifischen Amplifikaten des art- und gattungsspezifischen Nachweises der Dermatophyten, die in der **PCR 2** erfasst werden.



**Abbildung 3:** Gelelektrophorese **PCR 2:** 2 %iges Agarosegel; Trennstrecke: 7,0 cm; Elektrophoresebedingungen: 60 min bei 6 V/cm, Detektion: GelRed™ (Biotium, Inc.). RL2: Referenzleiter 2; PK: Positiv-Kontrolle; NK: Negativ-Kontrolle

**Tabelle 2:** Größe der einzelnen Banden des Mentype® MycoDerm<sup>QS</sup> für die jeweiligen Dermatomykoseerreger in zwei parallelen PCR-Ansätzen.

Parameter	PCR 1 Bandengröße [bp] <sup>#</sup>	PCR 2 Bandengröße [bp] <sup>#</sup>
<i>Aspergillus spp.</i>	226	-
<i>Microsporum spp.</i>	383	-
<i>Candida spp.</i>	421	-
<i>Epidermophyton floccosum</i>	497	-
<i>Trichosporon cutaneum</i>	557	-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	649	-
<i>Nannizzia gypsea</i> (Positivkontrolle <b>PCR 1</b> )	761	-
<i>Trichophyton interdigitale</i>	-	298*
<i>Trichophyton rubrum</i> (Positivkontrolle <b>PCR 2</b> )	-	373*
<i>Trichophyton spp.</i>	-	1036
Quality Sensor (QS)	1231	1231

<sup>#</sup>Durch das Laufverhalten der PCR-Amplifikate im Agarosegel kann es im Vergleich zu einem externen Längenstandard zu prozentualen Abweichungen von maximal 5 % der theoretischen Amplifikatgröße kommen.

\*Bei *T. interdigitale* und *T. rubrum* wird zusätzlich die Bande für *Trichophyton spp.* amplifiziert.

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

Für eine effektive Durchführung der Lyse und zur Gewinnung eines partikelfreien DNA Lysates empfehlen wir die Verwendung von Sampletype **i-sep**<sup>®</sup> SQ (Biotype GmbH; Bestellnummer 61-00201-0050 bzw. 63-00201-0050).

Die Lyse der Patientenproben wird je nach Beschaffenheit in zwei unterschiedlichen Protokollen behandelt. So wird die Lyse von **Haut-, Haar- und Nagelspäneproben** unter **6.1.1** beschrieben, die Lyse **ganzer Nägel** unter **6.1.2**.

### 6.1 Lyse der Patientenproben mit anschließender DNA-Isolierung unter Verwendung von Sampletype i-sep<sup>®</sup> SQ

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

Abweichend davon sollte jedoch beim **Elutionsschritt das Volumen des Elutionspuffers** von zumeist 200 µl auf **50 µl** reduziert werden. Um einen optimalen Gewebeaufschluss zu gewährleisten, empfehlen wir generell die **Inkubation mit Proteinase K über Nacht** oder für mindestens 12 Stunden.

#### 6.1.1 Lyse von Haut-, Haar- und Nagelspäneproben mit anschließender DNA-Isolierung (Sampletype i-sep<sup>®</sup> SQ)

**Im Folgenden wird die Probenlyse und DNA-Isolierung unter Verwendung des Qiagen QIAamp<sup>®</sup> 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.

1. **200 µl Lysepuffer** (180 µl ATL\* + 20 µl Proteinase K; vorgewärmt auf **56 °C**) zum Probenmaterial in den Filtereinsatz des Sampletype **i-sep**<sup>®</sup> SQ Probenahmeröhrchen geben und das Kombigefäß mit dem Deckel verschließen.
2. Im Thermoschüttler bei **56 °C** und **850 U/min** die Probe über Nacht oder für mindestens **12 Stunden** inkubieren.
3. Kondenstropfen im Deckel durch Zentrifugieren für **1 min** bei **max. 500 U/min** entfernen.
4. **200 µl Puffer AL** zugeben, das Kombigefäß mit dem Deckel verschließen und mischen (**15 s** vortexen).

---

\* Puffer fällt bei niedrigen Temperaturen aus. Puffer durch kurzes Erhitzen vor Zugabe zur Probe wieder lösen.



5. Im Thermoschüttler bei **70 °C** und **850 U/min** für **10 min** inkubieren.
6. Das Kombigefäß für **1 min** bei **14.000 U/min** zentrifugieren.
7. **Filtereinsatz verwerfen** und Auffanggefäß verschließen.
8. **200 µl 99 % Ethanol** dem Filtrat im Auffanggefäß zugeben, **15 s** vortexen und danach kurz abzentrifugieren.
9. Den Überstand (**600 µl Lysat**) in das **QIAamp® Mini Kit Säulchen** transferieren und bei **14.000 U/min** für **1 min** zentrifugieren. Auffanggefäß mit Durchfluss verwerfen.
10. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein neues Auffanggefäß einstecken.
11. **500 µl Puffer AW1** zugeben und bei **8.000 U/min** für **1 min** zentrifugieren. Auffanggefäß mit Durchfluss verwerfen.
12. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein neues Auffanggefäß einstecken.
13. **500 µl Puffer AW2** zugeben und bei **14.000 U/min** für **3 min** zentrifugieren. Auffanggefäß mit Durchfluss verwerfen.
14. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein neues Auffanggefäß einstecken.
15. Wiederholung der Zentrifugation bei **14.000 U/min** für **1 min**.
16. QIAamp® Mini Kit Säulchen in ein frisches, DNA-freies 1,5 ml Standardzentrifugenröhrchen transferieren und das Auffanggefäß wegwerfen.
17. **50 µl Puffer AE** zugeben und für **1 min** bei **Raumtemperatur** inkubieren.
18. **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 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**<sup>QS</sup> 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 durch den Puffer **L** ersetzt.

1. **100 µl Puffer L** (Mentype® **MycoDerm**<sup>QS</sup>; auf Gebrauchskonzentration eingestellt; **Raumtemperatur**) zum Probenmaterial in den Filtereinsatz des Sampletype **i-sep**<sup>®</sup> SQ Probenahmeröhrchen geben und das Kombigefäß mit dem Deckel verschließen.
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**<sup>QS</sup>; **Raumtemperatur**) und **20 µl** der **Proteinase K** zugeben, mit dem Deckel verschließen und mischen (vortexen).

Die weitere DNA-Extraktion und -Aufreinigung erfolgt analog zum **Kapitel 6.1.1** mit dem **Arbeitsschritt 2** (Inkubation über Nacht).

## 7. Troubleshooting

### 7.1 PCR-Amplifikation

#### PCR-Produkt vorhanden, QS-Bande unterdrückt oder fehlt ganz:

Stellen Sie sicher, dass die richtige QS-Verdünnung den einzelnen Ansätzen **PCR 1** bzw. **PCR 2** zugeordnet wurde.

Ist eine spezifische Erreger-Bande detektierbar, ist davon auszugehen, dass die PCR funktioniert hat. Bei einem ungünstigen Konzentrationsverhältnis von QS zur Erreger-DNA kann auf Grund zu hoher Konzentration an Erreger-DNA in der PCR die Bande des Quality Sensors unterdrückt sein.

#### Trichophyton spp. Bande und/oder QS-Bande unterdrückt oder fehlt ganz:

Bei **PCR 2** kann die *Trichophyton spp.* Bande ausfallen, wenn es sich um *T. rubrum* oder *T. interdigitale* handelt. Auch hier kann ein ungünstiges Konzentrationsverhältnis von QS zur Erreger-DNA zum Ausfall der QS-Bande führen. Außerdem werden kleinere Amplifikate bevorzugt vervielfältigt, was zu einer sehr schwachen *T. spp.*-Bande oder sogar zum Ausfall dieser führen kann.

#### Keine Bande detektierbar, QS nicht vorhanden:

Fehler im Setup:

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

Fehler des PCR-Gerätes (Amplifikation nicht erfolgt):

- Überprüfen Sie, ob das richtige PCR-Programm gewählt bzw. programmiert wurde.
- Überprüfen Sie die Funktionsfähigkeit des PCR-Gerätes.

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

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

Probleme der Gelelektrophorese und Gelfärbung:

- Siehe Problembehandlung Agarosegelelektrophorese weiter unten.

Zusätzliche Banden, Bandengröße nicht korrekt, Bande in der Negativkontrolle:

Reagenzien sind kontaminiert:

- 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.

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

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

Überschuss und Zusammenschluss von unverbrauchten Primern können auftreten (Banden sind aber kleiner als 200 bp).

**Hinweis!** Bitte bewahren Sie zur Kontaminationsvermeidung die Referenzleiter immer getrennt von den anderen Reagenzien auf.

## 7.2 Gelelektrophorese

Atypische Banden, geringe Qualität der Banden (Smiley-Effekt, Doppelbanden, Schmier):

- Überprüfen Sie die Konzentration des Laufpuffers (empfohlen ist 1x TBE).
- Stellen Sie sicher, dass das Agarosegel die richtige Konzentration aufweist (optimale Konzentration 2 %).
- Die Trennstrecke ist für eine optimale Auflösung der Banden zu kurz gewählt (optimal 5 - 7 cm).
- Überhöhte Spannungen verursachen eine zu rasche Migration kleiner DNA-Fragmente, zu niedrige hingegen führen zu einer geringen Bandenschärfe; außerdem kann überhöhte Spannung zum Überhitzen oder Schmelzen des Agarosegels oder zur Denaturierung der DNA führen (optimale Einstellung 80 V bis 120 V, 5 - 8 V/cm); bei zu hohen Voltzahlen kann es zur Bildung von Doppelbanden kommen.
- Bei 5 - 8 V/cm sollte die Geldicke nicht mehr als 5 mm betragen.
- Stellen Sie sicher, dass das Gel während der Elektrophorese immer vollständig mit Laufpuffer bedeckt ist.
- Vergewissern Sie sich, dass das Gel keine Luftblasen oder Fremdpartikel enthält; die Gele sollten stets langsam gegossen, entstandene Luftblasen ggf. mit der Pipette entfernt werden.
- Verwenden Sie beim Gießen des Gels stets saubere Gefäße (angetrocknete, alte Agaroserückstände beeinflussen den Gellauf negativ).

- Vergewissern Sie sich, dass die Agarose vor Beladen des Gels vollständig im Puffer gelöst ist (nicht gelöste/geschmolzene Agarose beeinflusst den Gellauf negativ).
- Färbelösung (z. B. GelRed™), die bereits während der Gelelektrophorese zugegeben wird, stört den Gellauf und verursacht atypische DNA-Bandenmuster.

### **7.3 Fehler in der Gelfärbung**

#### *Geringer Kontrast, schlechte bildliche Auflösung:*

- Überprüfen Sie die Konzentration des Färbebes.
- Die GelRed™ Lösung ist zu alt bzw. wurde durch Licht geschädigt; stellen Sie sicher, dass das Färbesbad lichtgeschützt aufgestellt und bereits angesetzte GelRed™-Lösung lichtgeschützt gelagert wird.
- Das Agarosegel wurde zu dick gegossen (> 5 mm), die Konzentration des Färbebes ist nicht mehr ausreichend (bitte beachten Sie die Hinweise des Herstellers [7]).
- Färbelösung (z. B. GelRed™), die bereits während der Gelelektrophorese zugegeben wird, stört den Gellauf und verursacht atypische DNA-Bandenmuster.

## 8. Referenzen

- [1] **Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B.** Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 166, 335-352, 2008.
- [2] **Seebacher C, Brasch J, Abeck D, Cornely O, Effendy I, Ginter-Hanselmayer G, Haake N, Hamm G, Hipler UC, Hof H, Korting HC, Mayser P, Ruhnke M, Schlacke KH, Tietz HJ.** German Society of Dermatology; German-speaking Mycological Society. Onychomycosis. *Mycoses* 50, 321-327, 2007.
- [3] [www.dmykg.de/information/leitlinien.html](http://www.dmykg.de/information/leitlinien.html)
- [4] **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.
- [5] **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Hrsg).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY US, 1989.
- [6] Biotium Inc. Safety Report of GelRed and GelGreen - A Summary of Mutagenicity and Environmental Safety Test Results from Three Independent Laboratories, 2008. [http://www.biotium.com/product/product\\_info/Safety\\_Report/GR%20&%20GG%20safety.pdf](http://www.biotium.com/product/product_info/Safety_Report/GR%20&%20GG%20safety.pdf)
- [7] GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain Product protocol. [http://www.biotium.com/product/product\\_info/Protocol/PI-41002.pdf](http://www.biotium.com/product/product_info/Protocol/PI-41002.pdf)

## 9. Symbole



Hersteller



In-vitro-Diagnostika



Bestellnummer



Inhalt ausreichend  
für n Reaktionen



Gebrauchsanweisung  
beachten

## Spezifikationen des Mentype® MycoDerm<sup>QS</sup> PCR-Amplifikationskits

### A Analytische Validierung

#### A a) Prüfmittel

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

#### 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 100 pg (PCR 2) und 250 pg (PCR 1) genomischer DNA getestet. Zusätzlich wurde 2 ng 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 300 ng pro PCR getestet.

**Ergebnisse:** Die Ergebnisse mit den Bakterien- und Pilzstämmen sind in Anlage 1 dargestellt. Humane DNA zeigte bis 90 ng pro PCR keine Reaktivität. Bei höheren humanen DNA-Mengen wurden unspezifische Banden festgestellt. Bei der tierischen DNA wurde bei 2 ng nur mit *Felis catus* eine leichte Kreuzreaktivität festgestellt, wobei die beobachteten Banden keine Übereinstimmung mit der Referenzleiter zeigten. 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).

**Methodik:** Es wurden Verdünnungsreihen von 5 pg - 100 pg genomischer DNA in der PCR 1 und 0,5 pg - 25 pg in der PCR 2 aus den entsprechenden Referenzstämmen getestet.

**Ergebnisse:** Für den Nachweis der Erreger wurde insgesamt eine analytische Sensitivität von mindestens 10 pg genomischer DNA erreicht.



#### A d) **Testung verschiedener DNA-Mischproben**

**Zielsetzung:** In klinischen Proben ist davon auszugehen, dass ein Überschuss an humaner DNA im Gemisch mit der DNA eines Erregers vorliegt. Da die PCR einer Endproduktthemmung unterliegt, wurden die analytische Sensitivität und Spezifität auch in Gegenwart eines Überschusses an humaner DNA getestet.

**Methodik:** Es wurden Gemische aus 10 pg der entsprechenden Pilz-DNA mit einer Konzentration von 300 ng humaner DNA in der PCR 1 und PCR 2 getestet.

Außerdem wurden fungale Gemische aus jeweils 25 pg DNA Erreger 1 (*M. gypseum*) und je 50 pg, 25 pg, 10 pg oder 5 pg DNA Erreger 2 (*C. albicans*) in der PCR 1 getestet.

**Ergebnisse:** Es wurde eine Sensitivität von mindestens 10 pg erregerspezifischer DNA auch in Gegenwart von 300 ng humaner DNA erreicht. In den Gemischen mit erregerspezifischer DNA wurde auch bis 300 ng keine Kreuzreaktivität mit humaner DNA festgestellt.

Bei den fungalen Mischproben konnten ebenfalls alle Banden detektiert und mit Hilfe der Referenzleitern korrekt zugeordnet werden.

#### A e) **Testung verschiedener Annealingtemperaturen bei 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.

**Methodik:** Es wurden 250 pg Erreger-DNA in der PCR 1 und 100 pg Erreger-DNA in der PCR 2 eingesetzt. Die Primeranlagerungstemperaturen in der PCR wurden um  $\pm 2$  °C variiert. Die Versuche wurden zusätzlich mit 300 ng humaner DNA durchgeführt.

**Ergebnisse:** In allen Fällen wurden in der Agarosegelelektrophorese erregerspezifische Banden detektiert. Bei Erniedrigung der Primeranlagerungstemperatur um 2 °C traten in Gegenwart von humaner DNA unspezifische Produkte im Bereich von 200 - 700 bp auf. Diese konnten jedoch keiner Bande aus den entsprechenden Referenzleitern zugeordnet werden.

#### A f) **Testung verschiedener PCR-Thermocycler**

**Zielsetzung:** PCR-Thermocycler unterschiedlicher Hersteller unterscheiden sich in ihren Spezifikationen. Insbesondere können unterschiedliche Heiz- und Kühlraten sowie unterschiedliche Temperaturregelungstechniken vorliegen.

**Methodik:** Es wurde ausgewählte Erreger-DNA in der PCR 1 (je 250 pg und 5 pg) sowie in der PCR 2 (je 100 pg und 10 pg) eingesetzt. Getestet wurden die Geräte *GeneAmp 9700* (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt,

Alu-Heizblock, Ag-Heizblock), *Eppendorf Mastercycler ep-S* (Eppendorf AG, Hamburg) und *Biometra T1* (Biometra GmbH, Göttingen).

**Ergebnisse:** In allen Fällen ab Heiz- und Kühlraten von 4 °C/s wurden in der Agarosegelelektrophorese erregerspezifische Banden und QS detektiert.

## **A g) Testung der Stabilität nach Anbruch**

**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. Auftaut wurde bei Raumtemperatur und die Reagenzien wurden vor Gebrauch durch Schütteln homogenisiert. Anschließend wurden die PCR 1 und PCR 2 mit Kontroll-DNA in einer Endkonzentration von 10 µg pro Reaktionsansatz durchgeführt.

**Ergebnisse:** Es konnten die PCR-Amplifikate aller Organismen detektiert und mit Hilfe der Referenzleiter korrekt zugeordnet werden. Die reinen QS-Proben und die mitgeführten NTCs (no template control) enthielten nur die QS-Bande.

## **B Leistungsbewertungsprüfung gemäß § 24 MPG (Medizinproduktgesetz)**

### **B a) Rahmenbedingungen**

Die klinische Leistungsbewertungsprüfung nach § 24 MPG erfolgte prospektiv in Kooperation mit der dermatologischen Abteilung eines Universitätsklinikums (klinischer Partner). Die Befreiung von der Genehmigungspflicht gemäß § 7 MPKPV wurde vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte erteilt. Ein zustimmendes Votum der zuständigen Ethikkommission lag vor. Patienteneinverständniserklärungen wurden vor der Probennahme erteilt.

Die Studienleitung, klinische Befundung, Pseudonymisierung, Probennahme und klassische Pilzdiagnostik (Mikroskopie und Kultur) wurde vom klinischen Partner durchgeführt. DNA-Extraktion und Multiplex-PCR erfolgte beim Kithersteller. Die PCR-Ergebnisse wurden durch den klinischen Partner mit der Patientendatenbank verknüpft und ausgewertet.

### **B b) Methodik**

#### **B b) a) Probennahme und Versand**

Die Probennahme wurde durch geschultes Klinikpersonal gemäß Standardverfahren der Klinik durchgeführt. Vor der Entnahme wurden die Entnahmestellen mittels 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Entnahme von Hautschuppen, Nagelspänen und Haarschäften stellte einen kritischen Schritt

dar. Insbesondere muss davon ausgegangen werden, dass das Untersuchungsgut nicht homogen mit Pilzelementen durchsetzt ist, was eine Teilung für Vergleichszwecke erschwert. Ein weiteres Problem ergab sich aus der oft beobachteten elektrostatischen Aufladung des trockenen Probenmaterials.

Als Tupfer für die PCR-Analytik wurden sterile FLOQSwabs der Firma Copan Italia Spa. (Brescia, IT; bezogen über Mast Diagnostics, Reinfeld) aus Polyurethanschäum verwendet, die zum Überführen in Reaktionsgefäße über eine Sollbruchstelle am Schaft verfügen. Mit Hilfe dieser Tupfer wurden Schleimhautabstriche, aber auch Hautschuppen aus sterilen Petrischalen aufgenommen (Tupfer gegen elektrostatische Aufladung vorher mit sterilem Wasser benetzt) 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 der Extraktion deutlich schlechter!

#### **B b) b) Nativpräparate**

Nativpräparate zur Hellfeld-Mikroskopie wurden nach William *et al.* [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 mikroskopisch untersucht (400x, Axioskop 40, Carl Zeiss Jena GmbH).

#### **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 Zimmertemperatur bebrütet und wöchentlich auf Wachstum kontrolliert. Bei Wachstum erfolgte eine kulturelle Differenzierung. 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 langsamem 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 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) und AuxaColor™ 2 Yeast Identification System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) nach Herstellerangaben verwendet.

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

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) (siehe Manual des Mentype® MycoDerm<sup>OS</sup> PCR-Amplifikationskits).

#### **B b) e) PCR, Agarose-Gelelektrophorese und Geldokumentation**

Diese experimentellen Schritte für die Multiplex-PCR erfolgten wie im Manual des Mentype® MycoDerm<sup>OS</sup> PCR-Amplifikationskits beschrieben.

Für die Probenvorbereitung der Agarosegelelektrophorese wurden 7 µl aus PCR 1 und 4 µl aus PCR 2 entnommen, mit TBE auf 10 µl ergänzt und mit 2 µl Auftragspuffer vermischt.

Die PCR-Ergebnisse für *T. rubrum* und *T. interdigitale* wurden zusätzlich durch Monoplex-PCRs bestätigt, die in der Literatur beschrieben sind [2, 3, 4].

#### **B c) Ergebnisse**

Es wurden 253 Patienten und als absolute Negativkontrolle 10 Gesunde (Nagelspäne) untersucht. Die klinische Untersuchung der Patienten ergab 122 *Tinea unguium* (Onychomykosen), 76 *Tinea peduum*, 21 *Tinea corporum et facies*, 16 *Tinea manuum*, 3 *Tinea inguinales*, und 15 mukosale Candidosen. Entsprechend wurden 122 Nagelspäne, 105 Hautschuppen und 26 direkte Tupferabstriche aufgearbeitet.

Die Nagelproben der 10 Gesunden waren für alle drei diagnostischen Methoden negativ. Diese Ergebnisse wurden nicht für die weiteren Berechnungen verwendet. Von den 253 Patienten wurden 87 (34,4 %) mikroskopisch, 80 (31,6 %) kulturell, 128 (50,6 %) mikroskopisch und/oder kulturell und 127 (50,2 %) in der PCR positiv bewertet. Die Übereinstimmung der Untersuchungsmethoden ist nachfolgend in Tabelle 1 zusammengefasst. Die mikroskopisch positiven Befunde konnten zu 44,8 % durch Kultur und zu 90,8 % durch PCR bestätigt werden. Bei positiven Kulturen lag zu 48,8 % eine positive Mikroskopie vor, während 80,0 % mittels PCR bestätigt werden konnten.

**Tab. 1: Übereinstimmung der Untersuchungsmethoden**

Kombinierte Aussage der diagnostischen Methoden			Ergebnisse	
Mikroskopie	Kultur	PCR	Anzahl	%
-	-	-	102	40,3
+	+	+	39	15,4
+	+	-	0	0,0
-	+	+	25	9,9
+	-	+	40	15,8
-	+	-	16	6,3
+	-	-	8	3,2
-	-	+	23	9,1

Die in der Kultur bestimmten Pilze sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Gemischte Infektionen wurden 10mal beobachtet. Diese umfassten auch alle Isolate von *Cryptococcus spp.* und *Trichosporon spp.* in Kombination mit *T. rubrum* oder *Candida spp.* Eine kombinierte Infektion mit *T. rubrum* und *Candida spp.* wurde in drei Fällen beobachtet. Die Probe, die in der Kultur *Mucor spp.* erbrachte, wurde klar als *T. rubrum* genotypisiert. Insgesamt wurden im Vergleich zur Kultur mittels PCR 39 zusätzliche Proben als *T. rubrum* und 12 zusätzliche Proben als *T. interdigitale* bestimmt. Diese PCR-Ergebnisse wurden mit zusätzlichen PCRs, wie in der Literatur beschrieben, bestätigt [2, 3, 4].

**Tab. 2: Vergleich der durch Kultur und PCR diagnostizierten Pilze**

Art oder Gattung	Diagnostische Methode		
	Kultur	PCR	PCR und Kultur
<i>Trichophyton rubrum</i>	28	65	26 <sup>a</sup>
<i>Trichophyton interdigitale</i>	2	14	2
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	1	1
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1	6	1
<i>Trichosporon spp.</i>	2	0	0 <sup>b</sup>
<i>Mucor spp.</i>	1	n. b.	0 <sup>c</sup>
<i>Cryptococcus spp.</i>	5	n. b.	0 <sup>b</sup>
<i>Candida spp.</i>	50	54	33

- <sup>a</sup>, eine weitere Probe wurde durch PCR 2 nur als *Trichophyton spp.* bestimmt, jedoch in einer zusätzlich durchgeführten Monoplex-PCR als *T. rubrum* bestätigt
- <sup>b</sup>, die PCR ergab positive Ergebnisse für *T. rubrum* oder *Candida spp.*
- <sup>c</sup>, die PCR ergab ein positives Ergebnis für *T. rubrum*.

Die spezifischen Herausforderungen bei der Bewertung von PCR-Tests für die Diagnose von Dermatophyten wurden in der Literatur vor Kurzem nochmals referiert [5]. 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 [6, 7]. Kondori *et al.* [8] haben deshalb vorgeschlagen, alle Proben, die mikroskopisch und/oder kulturell positiv sind, als richtig positiv zu betrachten. Die Tabellen 3 und 4 zeigen nachfolgend die Auswertung der Ergebnisse unter Verwendung dieses Vergleichsstandards für den Artnachweis von Dermatophyten (Tabelle 3; *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *E. floccosum*) und den Gattungsnachweis von *Candida* (Tabelle 4).

**Tab. 3: Diagnostische Werte für den artspezifischen PCR-Nachweis von Dermatophyten (*T. rubrum*, *T. interdigitale*, *E. floccosum*) im Vergleich zur Mikroskopie und/oder Kultur als Referenzmethode**

		Mikroskopie und/oder Kultur				
		positiv	negativ	Summe		
PCR	positiv	69	10	79	87,3	PPV [%]
	negativ	10	164	174	94,3	NPV [%]
	Summe	79	174	253		
		87,3	94,3			
		DSE [%]	DSP [%]			

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

**Tab. 4: Diagnostische Werte für den PCR-Nachweis von *Candida spp.* im Vergleich zur Mikroskopie und/oder Kultur als Referenzmethode**

		Mikroskopie und/oder Kultur				
		positiv	negativ	Summe		
PCR	positiv	42	12	54	77,8	PPV [%]
	negativ	25	174	199	87,4	NPV [%]
	Summe	67	186	253		
		62,7	93,5			
		DSE [%]	DSP [%]			

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

Die Ergebnisse der Leistungsbewertungsprüfung wurden in der Zeitschrift *Mycoses* publiziert [9].

**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] **Kanbe T.** Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008; 166: 307-17.
- [3] **Brillowska-Dabrowska A, Saunte DM, Arendrup MC.** Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1200-04.
- [4] **Beifuss B, Bezold G, Gottlöber P, Borelli C, Wagener J, Schaller M, Korting HC.** Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer. *Mycoses* 2011; 54: 137-45.
- [5] **Gräser Y, Czaika V, Ohst T.** Diagnostic PCR of dermatophytes - an overview. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012; 10: 721-5.
- [6] **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.
- [7] **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.
- [8] **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.
- [9] **Mehlig L, Garve C, Ritschel A, Zeiler A, Brabetz W, Weber C, Bauer A.** Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycosis. *Mycoses*. 2014 Jan;57(1):27-34.
- [10] **Hoog GS, Dukik K, Monod M.** *Mycopathologia* 2017; 182:5.

## Anlage 1: Verwendete Referenzstämme

### Teil 1:

Art	Stamm*	Berechnete Amplikongröße [bp]	
		PCR 1	PCR 2
<i>Aspergillus flavus</i>	N 203979/2008	226	-
<i>Aspergillus flavus</i>	M S06	226	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	N 120293/2006	226	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	M S07	226	-
<i>Aspergillus niger</i>	N 200939/2009	226	-
<i>Aspergillus niger</i>	M S05	226	-
<i>Aspergillus niger</i>	N 201250/2009	226	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	CBS 583.65	226	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	DSM 1943	226	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	M S12	226	-
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10	-	-
<i>Candida albicans</i>	N 08/2008 Strain C	421	-
<i>Candida albicans</i>	N 107441/2009	421	-
<i>Candida albicans</i>	DSM 1386	421	-
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 90030	421	-
<i>Candida glabrata</i>	N 2005-5	421	-
<i>Candida glabrata</i>	DSM 6425	421	-
<i>Candida guilliermondii</i>	N 490-1/2009-2	421	-
<i>Candida guilliermondii</i>	DSM 6381	421	-
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	421	-
<i>Candida krusei</i>	N 490-1/2007-3	421	-
<i>Candida krusei</i>	DSM 3433	421	-
<i>Candida parapsilosis</i>	N 107206/2009	421	-
<i>Candida parapsilosis</i>	N 107577/2009	421	-
<i>Candida parapsilosis</i>	DSM 5784	421	-
<i>Candida tropicalis</i>	N 102744/2008	421	-
<i>Candida tropicalis</i>	N 2/2008-3	421	-
<i>Candida tropicalis</i>	DSM 11953	421	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 24916	-	-
<i>Epidermophyton floccosum</i>	N 114327/2007	497	-
<i>Epidermophyton floccosum</i>	N 204179/2008	497	-
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CBS 358.93	497	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	DSM 2018	-	-
<i>Fusarium solani</i>	DSM 62416	-	-
<i>Malassezia furfur</i>	CBS 1878	-	-



## Anlage 1, Teil 2

Art	Stamm*	Berechnete Amplikongröße [bp]	
		PCR 1	PCR 2
<i>Malassezia globosa</i>	CBS 7966	-	-
<i>Microsporium canis</i>	CBS 282.63	383	-
<i>Microsporium canis</i>	N 203213/2007	383	-
<i>Microsporium canis</i>	CBS 190.57	383	-
<i>Nannizzia gypsea</i> <sup>(1)</sup>	N 203237/2007	761	-
<i>Nannizzia gypsea</i> <sup>(1)</sup>	N 203353/2002	761	-
<i>Nannizzia gypsea</i> <sup>(1)</sup>	CBS 258.61	761	-
<i>Microsporium audouinii</i>	CBS 280.63	761	-
<i>Microsporium audouinii</i>	CBS 344.50	761	-
<i>Microsporium audouinii</i>	CBS 119449	761	-
<i>Microsporium ferrugineum</i>	CBS 457.80	761	-
<i>Microsporium ferrugineum</i>	CBS 426.63	761	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DSM 848	-	-
<i>Penicillium griseovulvum</i>	DSM 896	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	DSM 70398	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DSM 70404	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSM 70449	-	-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	N 11/06	649	-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	N 2002-C	649	-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	DSM 9122	649	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20231	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSM 20044	-	-
<i>Trichophyton interdigitale</i>	N 200454/2009	-	298, 1036
<i>Trichophyton interdigitale</i>	N 201029/2008	-	298, 1036
<i>Trichophyton interdigitale</i>	CBS 558.66	-	298, 1036
<i>Trichophyton rubrum</i>	N 107241/2009	-	373, 1036
<i>Trichophyton rubrum</i>	N 107246/2009	-	373, 1036
<i>Trichophyton rubrum</i>	CBS 392.58	-	373, 1036
<i>Trichophyton tonsurans</i>	CBS 120.65	-	1036
<i>Trichophyton tonsurans</i>	CBS 483.76	-	1036
<i>Trichophyton tonsurans</i>	CBS 496.48	-	1036
<i>Trichophyton verrucosum</i>	CBS 134.66	-	1036
<i>Trichophyton verrucosum</i>	CBS 554.84	-	1036
<i>Trichophyton verrucosum</i>	CBS 564.50	-	1036
<i>Trichophyton violaceum</i>	CBS 319.31	-	1036
<i>Trichophyton violaceum</i>	CBS 730.88	-	1036
<i>Trichosporon cutaneum</i>	DSM 70675	557	-
<i>Trichosporon cutaneum</i>	DSM 70698	557	-

\*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, Mauersberger, Dresden  
 N, Nenoff, Mölbis.

<sup>(1)</sup>Vormals: *Microsporium gypseum* [10]

## **Notizen**

## Notizen