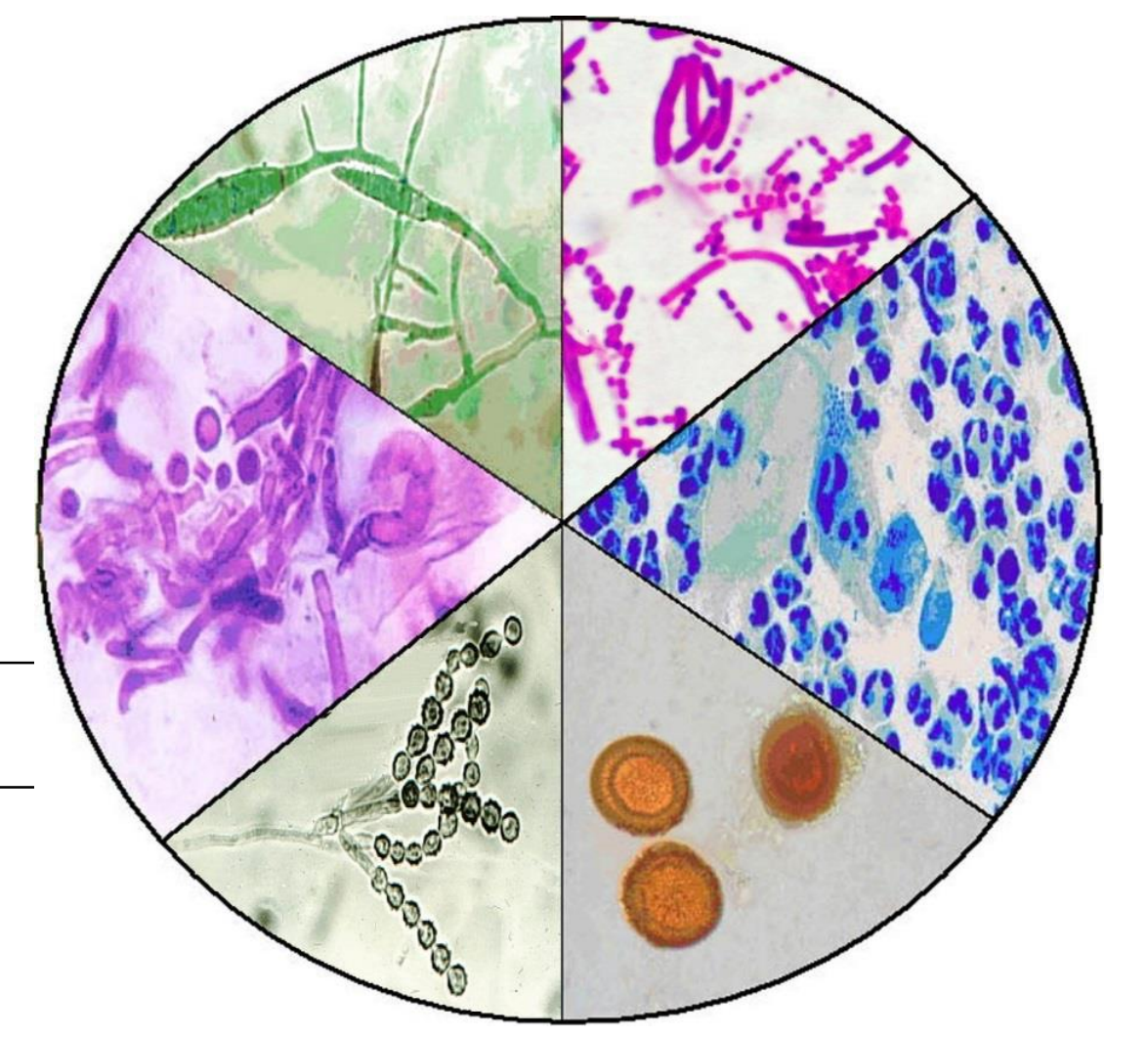


# Molekularbiologische Charakterisierung von *Trichophyton rubrum* und *Trichophyton interdigitale* isoliert von Patienten mit Onychomykose – Identifizierung der Dermatophyten mit PCR und Sequenzierung der ITS-Region der rRNA sowie MALDI-TOF Massenspektroskopie



Mehlhorn C.<sup>1</sup>, Uhrlaß S.<sup>1</sup>, Schroedl W.<sup>2</sup>, Bartosch T.<sup>2</sup>, Maier T.<sup>3</sup>, Krüger C.<sup>1</sup>, Paasch U.<sup>4</sup>, Simon J.-C.<sup>4</sup>, Nenoff P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Labor für medizinische Mikrobiologie, Partnerschaft Dr. C. Krüger & Prof. P. Nenoff, Mölbis

<sup>2</sup>Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Institut für Bakteriologie und Mykologie, Leipzig

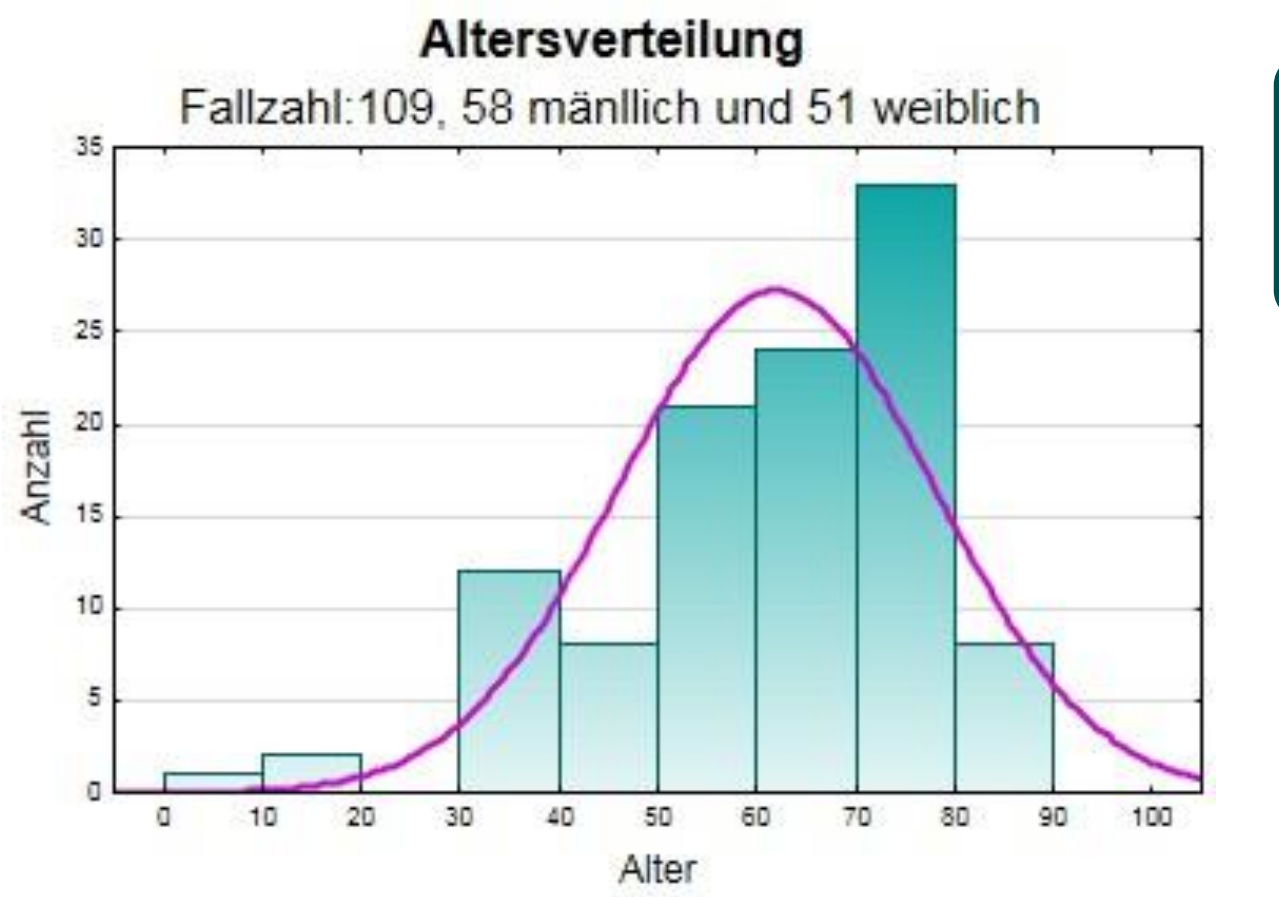
<sup>3</sup>Brüker Daltonik GmbH, Microbiological Laboratory/R&D Bioanalytics, Bremen

<sup>4</sup>Universitätsklinikum Leipzig AöR und Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Leipzig

## Fragestellung

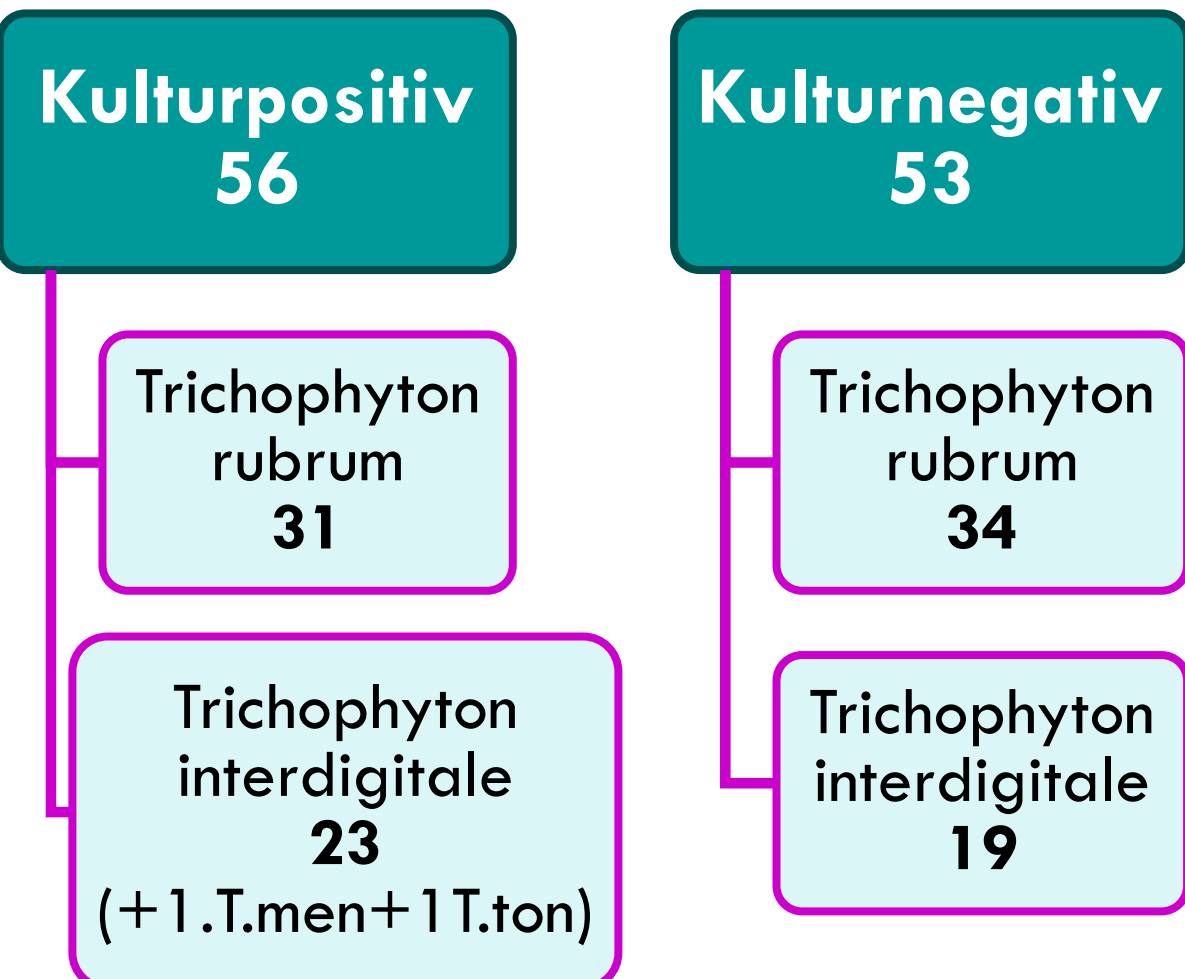
Die Diagnostik der Onychomykose mit Nativpräparat und Pilzkulturen wird heute durch molekularbiologische Methoden ergänzt. Die Validität des molekularbiologischen Dermatophyten-DNA-Nachweises direkt im Nagelmaterial mit PCR wurde mit molekularen Methoden überprüft.

## Patientenkollektiv:



Durchschnittsalter der Patienten: 62 Jahre

## 109 Nagelproben



## Mikroskopie und Nativpräparat

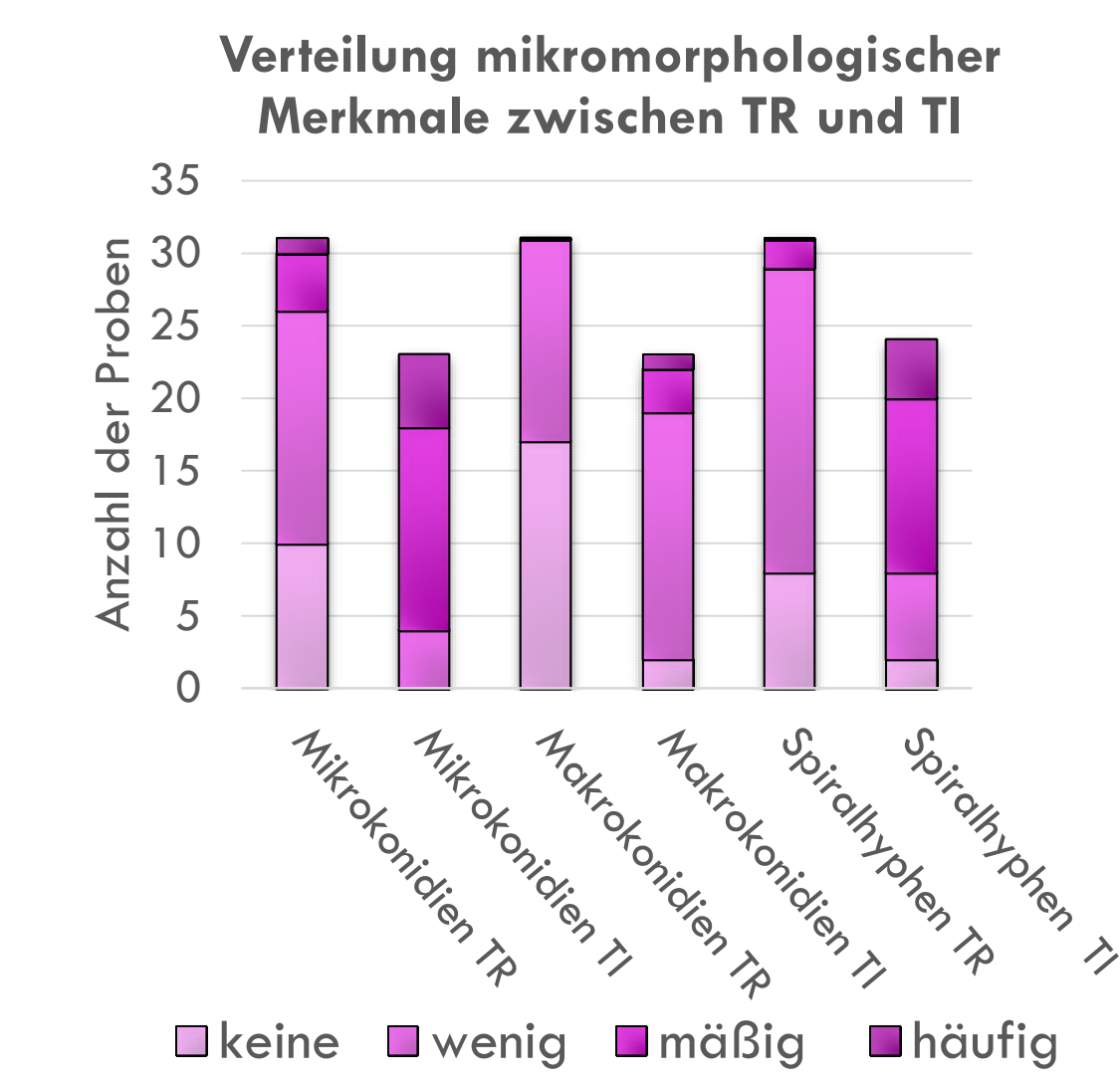
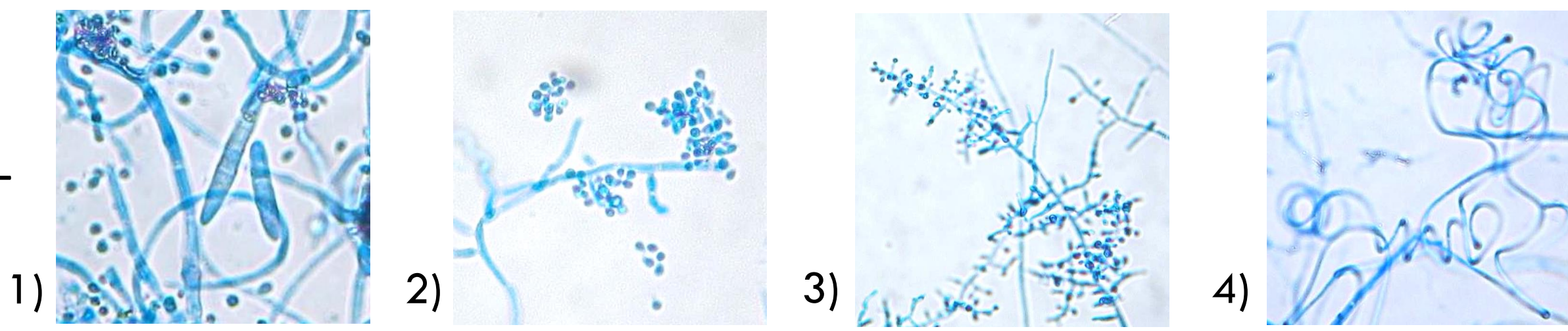
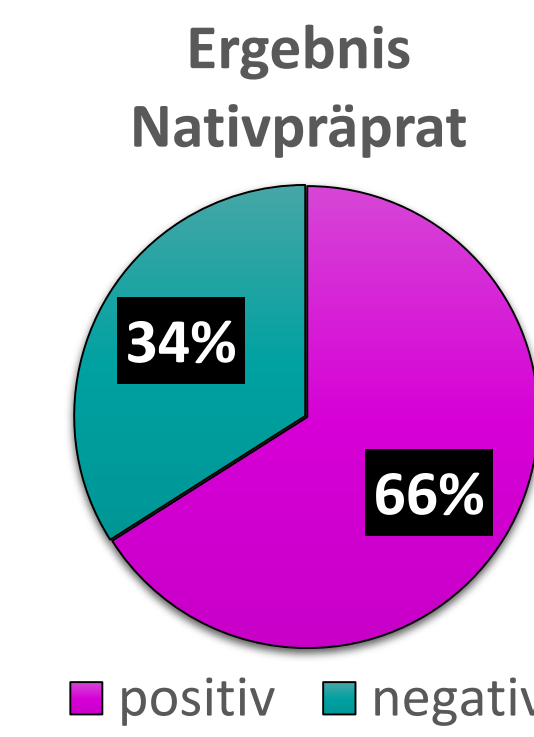
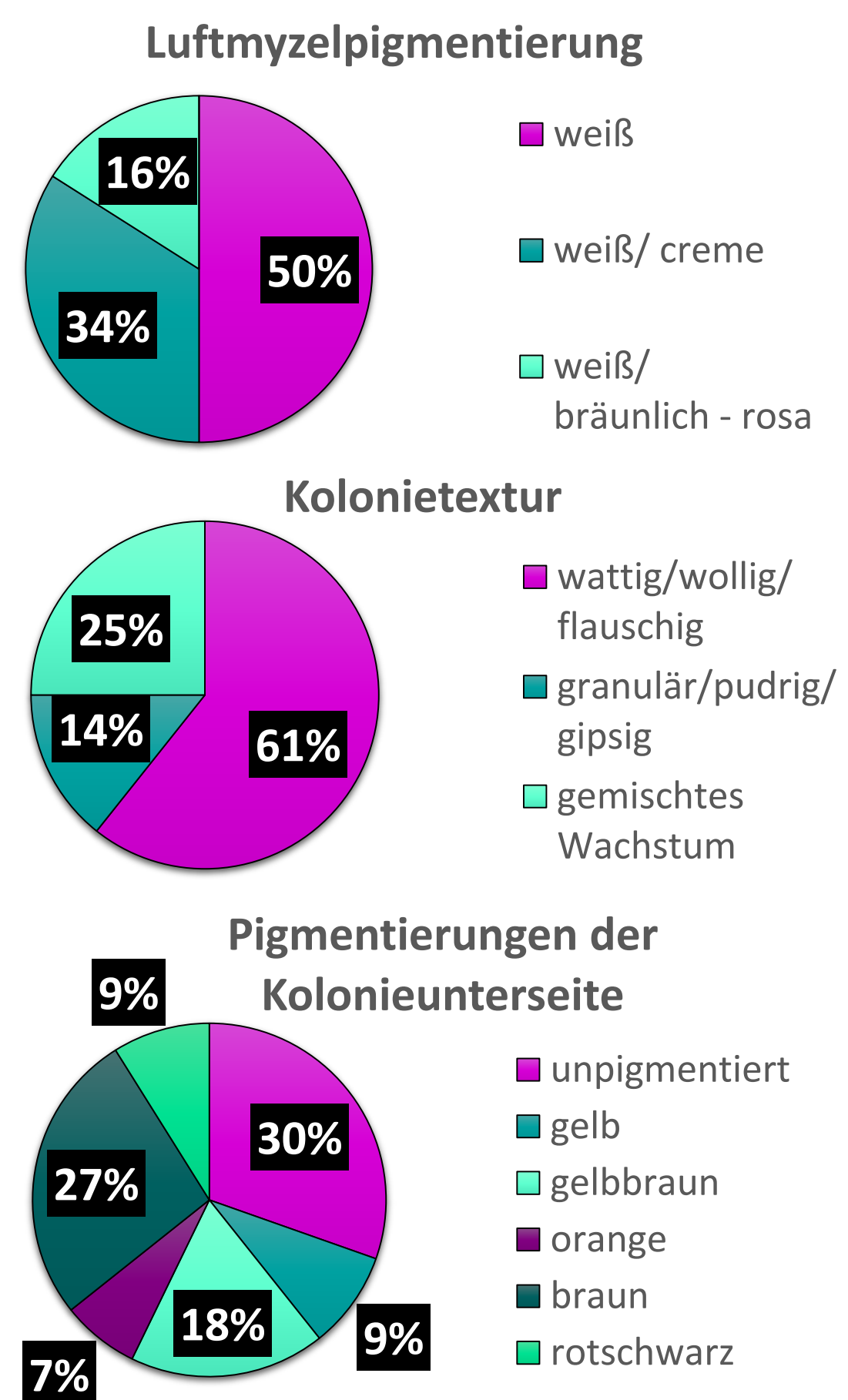


Abb. 1 Charakteristische Mikromorphologie von *Trichophyton interdigitale*:

- 1) zylinderförmige Makrokonidien
- 2) Mikrokonidien (Botrytisform)
- 3) Mikrokonidien (baumartig verzweigt)
- 4) Spiralthyphen



## Kultur



## Vielfalt der Dermatophytenkulturen

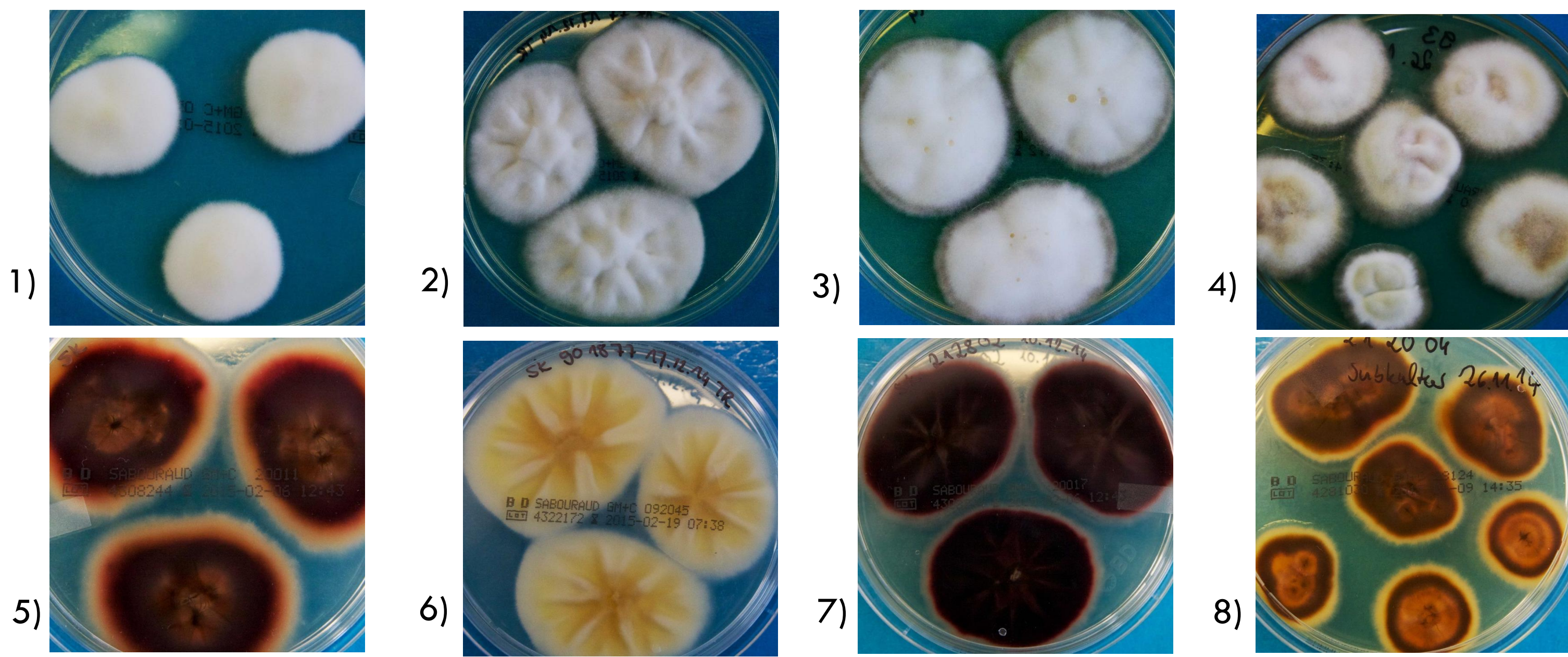


Abb. 3 Vorder (1-4) - und Rückseiten (5-8) ausgewählter Kulturen von *Trichophyton rubrum* auf Sabouraudagar

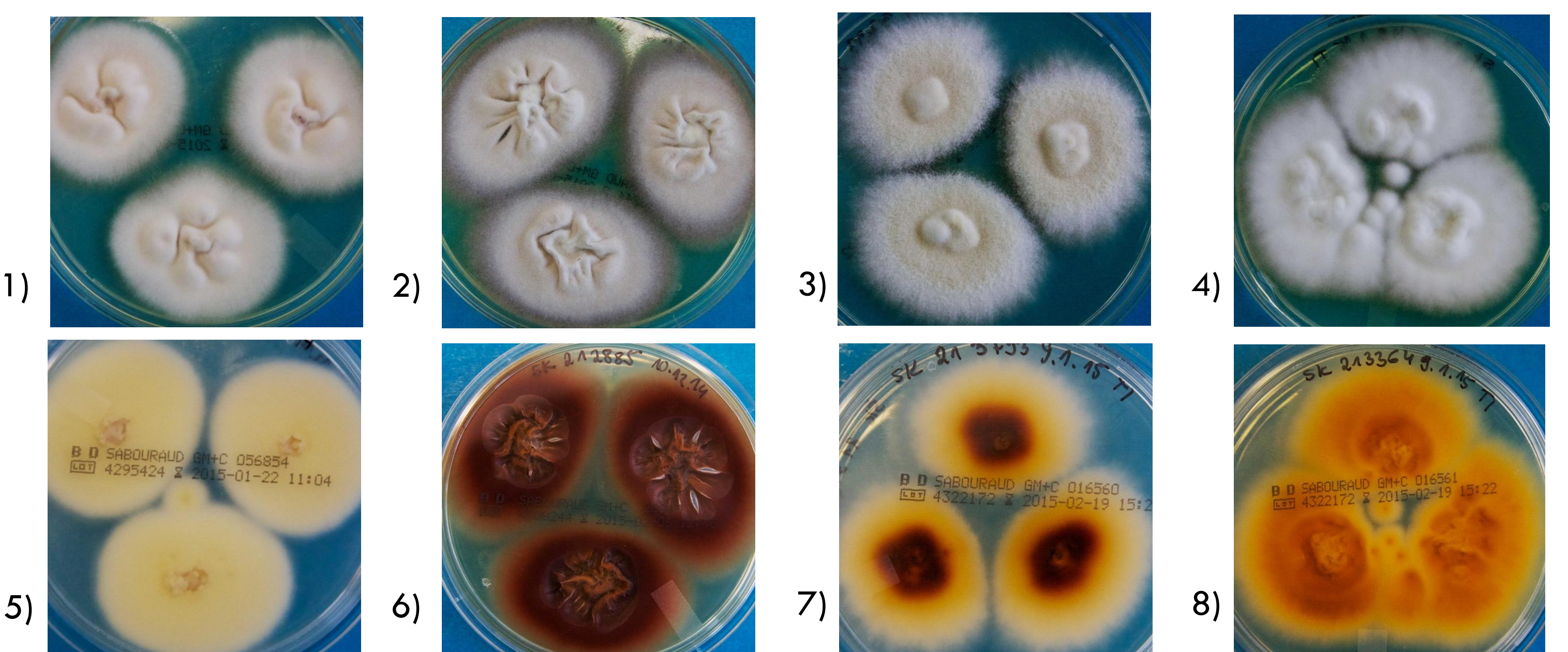


Abb. 4 Vorder (1-4) - und Rückseiten (5-8) ausgewählter Kulturen von *Trichophyton interdigitale* auf Sabouraudagar

## Methoden

- Material: 109 Nagelproben, TR oder TI mit Kultur und/oder PCR nachweisbar
- konventionell: Blancophor-Präparat und kulturelle Diagnostik
- molekularbiologisch: PCR-ELISA und Sequenzierung der Dermatophyten-ITS-Region (18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA)
- zusätzlich: Analyse mit Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)

## Schlussfolgerung

Die molekularen Methoden sind sehr gut geeignet, die Dermatophyten bei Onychomykose direkt im Nagelmaterial, ohne vorherige Kultivierung, mit hoher Zuverlässigkeit zu identifizieren. Insbesondere bei Kultur-negativen Proben hat sich die PCR zum DNA-Dermatophyten-Nachweis als eine hochspezifische und empfindliche Methode erwiesen.

## Phylogenie ITS 2-Region rRNA

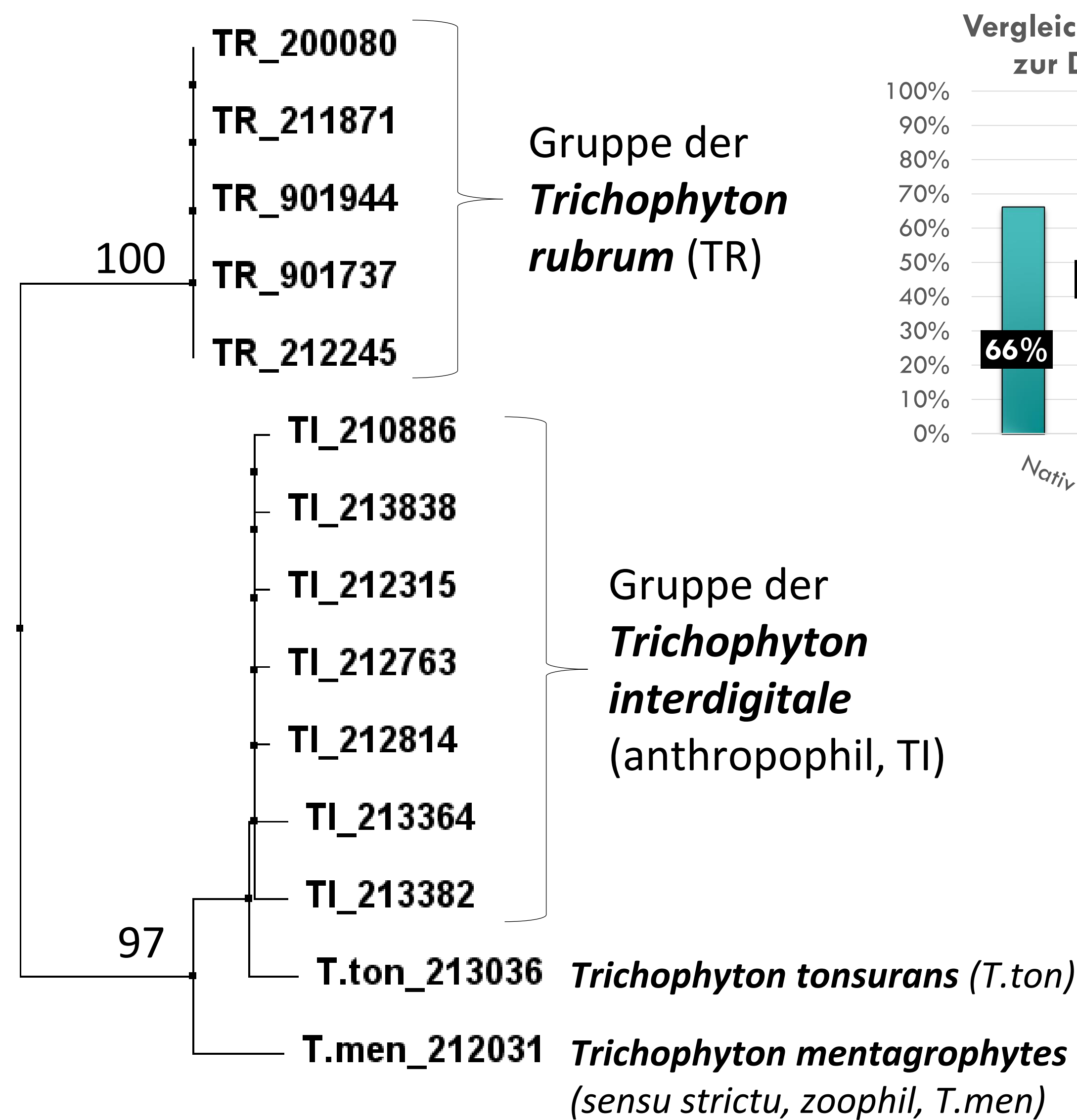
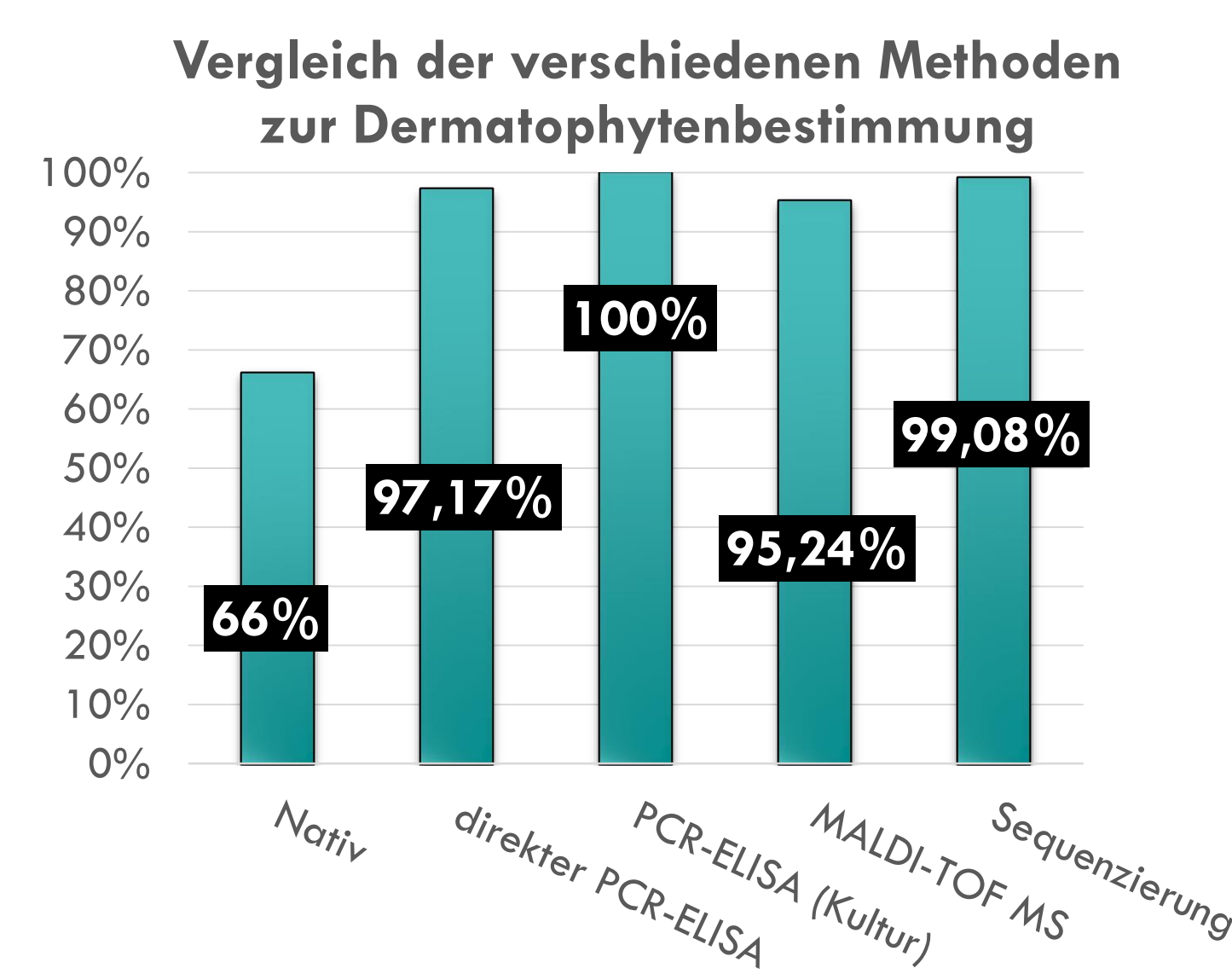


Abb. 4 Phylogenetischer Baum (Neighbor-Joining Methode, Jalview 2.9, Bootstrap-Werte kalkuliert mit MEGA)

Abb. 6 Ausschnitte des Multiplen Alignments der ITS 2-Region der rRNA (Jalview 2.9), identische Säulen nicht gezeigt

## Ergebnisse



Mit MALDI-TOF MS waren TR und TI sehr gut voneinander zu unterscheiden, trotz großer Ähnlichkeit der Spektren. Innerhalb der Spezies ließen sich klonale Unterschiede feststellen.

## MALDI-TOF MS

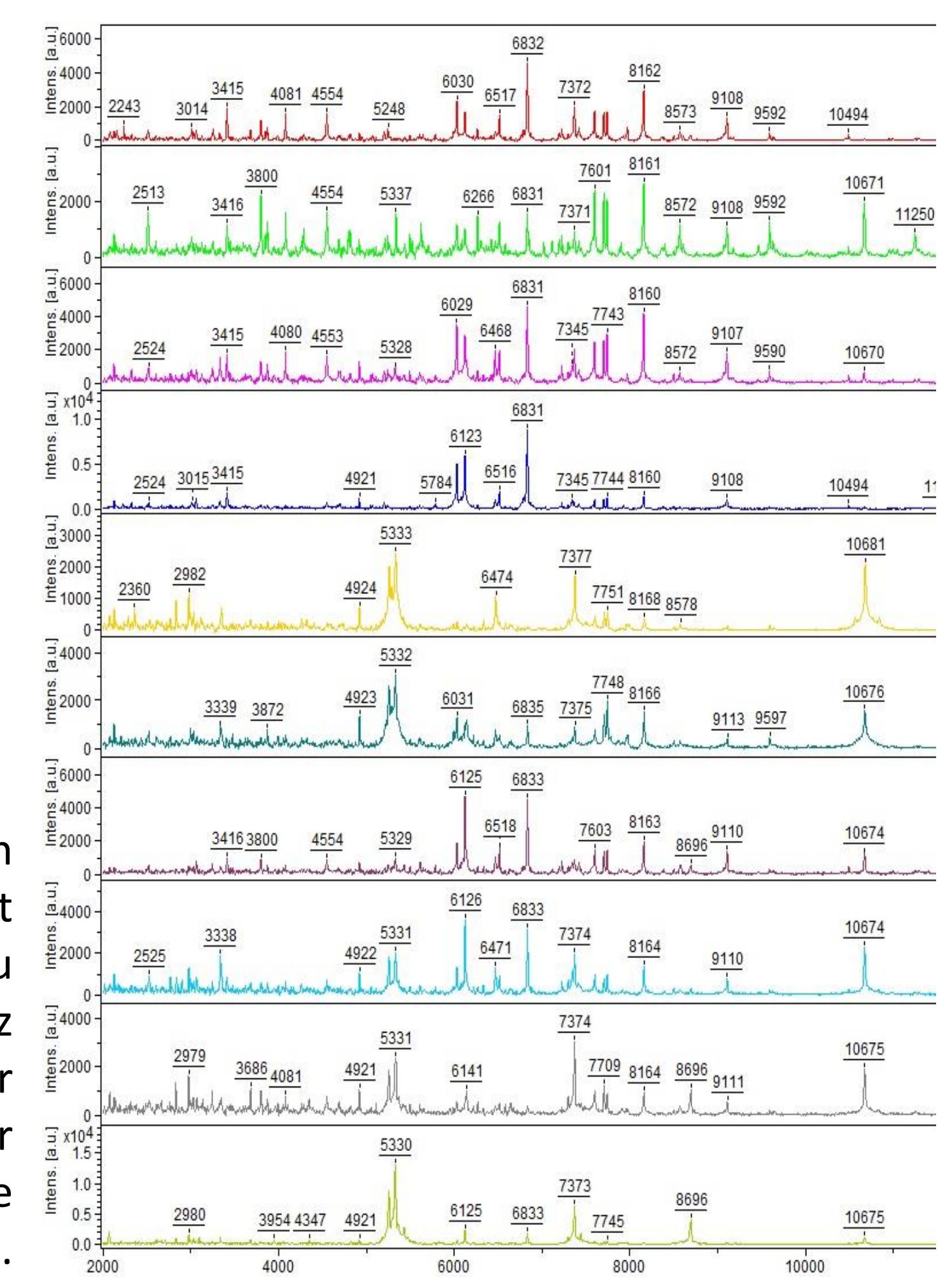


Abb. 5 MALDI-TOF MS Spektren von *Trichophyton rubrum*

## Sequenzierung der ITS 2-Region rRNA

