

Der Hautarzt

Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie und verwandte Gebiete

Elektronischer Sonderdruck für

P. Nenoff

Ein Service von Springer Medizin

Hautarzt 2013 · 64:283–289 · DOI 10.1007/s00105-013-2562-9

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

zur nichtkommerziellen Nutzung auf der
privaten Homepage und Institutssite des Autors

**I. Winter · S. Uhrlaß · C. Krüger · J. Herrmann · G. Bezold · A. Winter · S. Barth · J.C. Simon · Y. Gräser ·
P. Nenoff**

Molekularbiologischer Direktnachweis von Dermatophyten im klinischen Material bei Verdacht auf Onychomykose und Tinea pedis

Eine prospektive Studie zum Vergleich konventioneller dermatomykologischer
Diagnostik und der Polymerasekettenreaktion

Hautarzt 2013 · 64:283–289
 DOI 10.1007/s00105-013-2562-9
 Online publiziert: 28. März 2013
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

I. Winter¹ · S. Uhrlaß² · C. Krüger² · J. Herrmann² · G. Bezold³ · A. Winter¹ · S. Barth¹ · J.C. Simon⁴ · Y. Gräser⁵ · P. Nenoff²

¹ Praxisklinik Chirurgie, Oschatz

² Haut- und Laborarzt/Allergologie, Andrologie, Labor für medizinische Mikrobiologie, Partnerschaft Prof. Dr. med. Pietro Nenoff & Dr. med. Constanze Krüger, Mölbis

³ Gemeinschaftspraxis Dermatologie, Neu-Ulm

⁴ Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Leipzig

⁵ Konsiliarlabor für Dermatophyten, Universitätsmedizin Berlin

Molekularbiologischer Direktnachweis von Dermatophyten im klinischen Material bei Verdacht auf Onychomykose und Tinea pedis

Eine prospektive Studie zum Vergleich konventioneller dermatomykologischer Diagnostik und der Polymerasekettenreaktion

Die dermatomykologische Diagnostik beruht auf dem mikroskopischen und kulturellen Erregernachweis. Eine Regel besagt, dass erst nach dem Vorliegen eines positiven mikroskopischen Präparates lokal antimykotisch behandelt werden sollte, und frühestens nachdem die kulturelle Untersuchung einen Erreger ergeben hat, beginnt die systemische antimykotische Therapie [19, 21, 23]. Das mikroskopische Nativpräparat ermöglicht selbst durch Zugabe von kontrasterhöhenden Farbstoffen oder fluoreszierenden optischen Aufhellern nur einen orientierenden Direktnachweis von Pilzelementen im klinischen Material, ohne dass ein Rückschluss auf Gattung oder Art des Erregers möglich ist [18]. Der kulturelle Erregernachweis ist spezifischer als das Kalilaugenpräparat, dafür jedoch langwierig, die Ergebnisse liegen erst nach 3 bis 4 Wochen Inkubationsdauer vor [20]. Zudem können avitale Pilzelemente zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

Erst seit wenigen Jahren finden molekulare Nachweismethoden auf Grundlage der Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) Einzug in

die Dermatomykologie [1, 3, 5, 24]. Zur molekularbiologischen Identifizierung von Dermatophyten sind verschiedene Genregionen als Zielsequenzen für die Primer verwendet worden, u. a. der „Internal Transcribed Spacer“ (ITS) der ribosomalen DNS und das Topoisomerase-II-Gen [11].

Das Prinzip der Methode basiert darauf, dass die Dermatophyten-DNS in einem ersten Arbeitsschritt aus dem keratinhaltigen Material der Nägel sowie Hautschuppen extrahiert wird. In einem zweiten Arbeitsschritt wird die DNS mittels spezifischer Primer – das sind kurze, die jeweilige Dermatophyten-DNS spezifisch erkennende und bindende Sequenzen aus Nukleinsäurebasen – gebunden und im sog. Thermocycler amplifiziert. Es schließt sich ein dritter Detektionsschritt an, bei dem die amplifizierte bzw. vermehrte DNS nachgewiesen wird. Dieses „Sichtbarmachen“ oder Visualisieren der DNS geschieht entweder mittels Agarose-Gel-Elektrophorese oder alternativ mit einer Sonden-gestützten ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“)-Technik. Dieser molekularbiologi-

sche Dermatophytennachweis direkt aus dem Nagelmaterial erlaubt eine Sofortdiagnostik innerhalb von 24 h [2]. Als spezifische Sequenz für die Primer wurde hier das Topoisomerase-II-Gen genutzt. Der Uniplex-PCR-ELISA-Test erfasste separat *Trichophyton (T.) rubrum*, *T. interdigitale* und *Epidermophyton (E.) floccosum* [27].

Methoden

Patienten und Materialentnahme

Über einen Zeitraum von 3 Monaten wurden 218 Patienten mit dem klinischen Verdacht auf eine Fuß- und Nagelpilzinfektion in die Studie aufgenommen. Alle Patienten wiesen disponierende Faktoren für eine Tinea pedis und/oder Onychomykose auf: Ulzerationen unterschiedlicher Genese am Unterschenkel und/oder an den Füßen/Zehen bzw. plantar, chronisch venöse Insuffizienz (Varikosis, Ulcus cruris venosum), arteriell bedingte Ulzerationen, periphere arterielle Verschlusskrankheit, diabetisches Fußsyndrom (Malum perforans), Lymphödem (idiopathisch, postinflammatorisch, post-

Tab. 1 Sequenzen der Primer und Sonden, basierend auf der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA

AB096064.1	<i>Trichophyton rubrum</i>
Topoisomerase-II-Gen	
Primer_TR-D-Dig	CGGCTAGGAGGGCGTGGTAGAA
Primer_TR-U	GCCTGTGTTCCGCTCATTCTT
Sonde_TR-P-B	CATATGATTACCTTCTGAGCGTAAG
Länge des Fragments: 907 Basen	
AB096065.1	<i>Trichophyton interdigitale</i>
Topoisomerase-II-Gen	
Primer_TI-D-Dig	GGTGCCAGCCATGTCGTAGAC
Primer_TI-U	GCATGATTAGAAGTGAATGCTG
Sonde_TI-P-B	TCGAAGCCTTGTTAAAAGAAGG
Länge des Fragments: 390 Basen	
AB096069.1	<i>Epidermophyton floccosum</i>
Topoisomerase-II-Gen	
Primer_EF-D-Dig	GATTCAGTTGTACTAAGTGGACA
Primer_EF-U	CCGATCCATCCCTCGGTGGTT
Sonde_EF-P-B	ACCTTTGAGTGTAAGTCCGCTC
Länge des Fragments: 1330 Basen	
D „downstream“, U „upstream“.	

operativ) und Stauungsdermatitis (Dermoeidermatitis bei Lymphödem, kardial bedingte Stauung).

Nach Desinfektion des betreffenden Areals mit Ethanol wurden von der Fußsohle, dem Zehenzwischenraum sowie vom Zehennagel Hautschuppen und Nagelspäne mittels Skalpell entnommen. Eine vorherige antimykotische Lokal- und systemische Therapie war für mindestens 4 Wochen vor der Untersuchung ausgesetzt worden. Die mykologische Diagnostik umfasste das fluoreszenzoptische Präparat, die kulturelle Anzucht von Pilzen sowie den PCR-ELISA-Assay zum Nachweis von Dermatophyten-DNS.

Fluoreszenzoptisches Pilzpräparat

Haut- oder Nagelmaterial (mindestens 5 bis 10 Hautschüppchen oder Nagelspäne) wurden mittels steriler (abgeflammter) Impföse in einen Tropfen Blancophor®-Lösung auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Inkubiert wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einer „feuchten Kammer“. Die Präparate werden mittels Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Kultureller Dermatophytennachweis

Die kulturelle mykologische Untersuchung erfolgte auf Sabouraud-4%-Glukose-Agar (Sifin GmbH, Berlin), dem zusätzlich Chloramphenicol 100 mg/l zur Unterdrückung des Bakterienwachstums zugesetzt wurde. Für die selektive Anzucht von Dermatophyten kam Sabouraud-Glukose-Agar + Actidion® (= Cycloheximid) zur Anwendung (Mycosel®-Agar, Becton Dickinson, Heidelberg), auch diesem Nährmedium wurde Chloramphenicol 100 mg/l beigemischt.

PCR-ELISA-Assay zum Nachweis von Dermatophyten-DNS

Isolierung der DNS

Die Extraktion der DNS aus den Pilzen in Hautschuppen und Nagelmaterial erfolgte mittels Qiamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden). Nach einem enzymatischen Verdau der Zellmembranen mit Proteinase K wird die freigewordene DNS während eines Zentrifugationsschrittes an eine Silikatmembran einer Spinnsäule gebunden. Die gebundene DNS wird in Folge in 3 Schritten von störenden Proteinen gereinigt und mit einem kleinen Volumen-Elutionspuffer von der Spinnsäule eluiert.

Es werden sowohl Human-DNS als auch Erreger-DNS isoliert.

Polymerasekettenreaktion

Durch spezifische Primer erfolgte im Mastercycler mittels PCR die Vervielfältigung der Dermatophyten-DNS. Ein Primer des Primerpaars war mit Digoxigenin am 5'Ende markiert. Auf diese Weise ist das entstandene PCR-Produkt mit Digoxigenin markiert, um so die Detektion der DNS zu ermöglichen. Zur Identifizierung wurde das Topoisomerase-II-Gen genutzt, die Primersequenzen sind von Hsu et al. [13] beschrieben worden (■ Tab. 1).

Der Mastermix enthielt 2,5 mM MgCl₂, 5*Puffer mit 400 mM Tris-HCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄ und 0,1% Tween-20, außerdem 200 µM je dNTP und die Taq-DNA-Polymerase (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld). Der PCR-Ansatz wurde mit einem Endvolumen von 30 µl zusammengestellt. Das sind 6 µl Mastermix, 16,5 µl H₂O, 0,75 µl Primer-U (20 µM Primer unmarkiert von biomers.net, Ulm), 0,75 µl Primer-D-Dig (Primer markiert mit Digoxigenin, Eurofins MWG Operon, Ebersberg) und 6 µl DNS als Template. Als Negativkontrolle kam stattdessen 6 µl Wasser zum Einsatz, als Positivkontrolle 6 µl positive DNS. Die Tubes wurden mit Mineralöl überschichtet, um Verdunstungen und Kontaminationen zu vermeiden. Das verwendete PCR-Programm beinhaltete die Initialdenaturierung bei 95°C für 5 min 30 s, es erfolgten 42 Zyklen: Denaturieren bei 95°C für 15 s, „Annealing“ bei 63°C für 20 s, „Extension“ bei 72°C für 90 s und „Final Extension“ bei 72°C für 7,7 min.

PCR-ELISA (DIG-Detektion)

Nach Amplifikation wurde das chemisch denaturierte PCR-Produkt mittels biotinylierter Sonde (Sequenz ebenfalls vom Topoisomerase-II-Gen) hybridisiert und an eine Streptavidin-beschichtete Festphase gebunden. Ungebundene, unspezifische Amplifikationsprodukte und DNS werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Nach Zugabe eines Peroxidase-konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers und Substrates (ABTS-Tabletten, Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim) zeigt die Farbentwicklung

I. Winter · S. Uhrlaß · C. Krüger · J. Herrmann · G. Bezold · A. Winter · S. Barth · J.C. Simon · Y. Gräser · P. Nenoff

Molekularbiologischer Direktnachweis von Dermatophyten im klinischen Material bei Verdacht auf Onychomykose und Tinea pedis. Eine prospektive Studie zum Vergleich konventioneller dermatomykologischer Diagnostik und der Polymerasekettenreaktion**Zusammenfassung**

Hintergrund. Onychomykosen sind weltweit im Anstieg begriffen. Vor einer antimykotischen Therapie steht die exakte Diagnostik, die derzeit mit den Routineverfahren Mikroskopie und mit kulturellem Erregernachweis erfolgt. Diese konventionellen mykologischen Methoden weisen jedoch Nachteile auf. Das mikroskopische Präparat ermöglicht keine Gattungs- oder Speziesidentifizierung, es werden lediglich avitale Pilzelemente nachgewiesen. Der Zeitaufwand für die Pilzkultur ist hoch, beim kulturellen Nachweis besteht zudem eine beträchtliche subjektive Fehlermöglichkeit bei der Bestimmung der Pilzspezies.

Patienten und Methodik. Über einen Zeitraum von 3 Monaten wurden in einer chirurgischen Praxisklinik insgesamt 218 Patienten – alle wiesen disponierende Faktoren für

eine Nagel- und Fußpilzinfektion auf – mit Verdacht auf Tinea pedis und/oder Onychomykose in die prospektive Studie aufgenommen. Zusätzlich zur konventionellen Diagnostik der Nagelspäne und Hautschuppen mittels Nativpräparat mit Blancophor® und Pilzkulturen wurde ein PCR (Polymerasekettenreaktion)-ELISA-Test zum Direktnachweis von Dermatophyten-DNS durchgeführt. Letzterer erlaubt aufgrund von spezifischen Primern, die gegen das Topoisomerase-II-Gen gerichtet sind, die Identifizierung von *Trichophyton* (*T. rubrum*, *T. interdigitale*) und *Epidermophyton floccosum* im klinischen Material.

Ergebnisse. Kulturell waren bei 23,9% der Patienten Dermatophyten nachweisbar (*T. rubrum* oder *T. interdigitale*). Mittels PCR-ELISA-Test konnte dagegen bei 29,9% der Patienten Dermatophyten-DNS von entweder

T. rubrum oder *T. interdigitale* nachgewiesen werden. *Epidermophyton floccosum* wurde weder kulturell noch mit PCR gefunden. Die PCR-ELISA-Technik zum Nachweis von Dermatophyten-DNS wies im Vergleich zur Kultur eine höhere diagnostische Sensitivität (79,0%) und diagnostische Spezifität (85,5%) auf.

Schlussfolgerung. Der PCR-ELISA-Test ermöglicht eine schnelle und sehr spezifische sowie empfindliche Diagnostik einer Dermatophytose der Nägel und der Haut innerhalb von 24 (bis maximal 48) Stunden mit Identifizierung des Erregers bis zur Speziesebene.

Schlüsselwörter

Trichophyton rubrum · *Trichophyton interdigitale* · Diagnostische Sensitivität · Diagnostische Spezifität · Dermatophytose

Molecular biological detection of dermatophytes in clinical samples when onychomycosis or tinea pedis is suspected. A prospective study comparing conventional dermatomycological diagnostics and polymerase chain reaction**Abstract**

Background. The prevalence of onychomycosis is rising worldwide. Before starting antifungal treatment, an exact mycological diagnosis should be obtained. The current laboratory diagnosis of dermatomycoses is based on the detection of the causative agent by microscopy and culture. These conventional diagnostic methods for fungal infections often are not the best solution because they are time-consuming, cultures are false-negative and direct examination identifies non-vital structures which cannot be used for speciation.

Patients and methods. A total of 218 patients presenting in a surgical practice over 3 months with clinical signs of tinea pedis and/or onychomycosis were involved in the prospective study. All patients had predispos-

ing factors for tinea pedis and tinea unguium, such as vascular insufficiency, diabetes mellitus, and leg ulcers. Nail specimens and skin scrapings were investigated for fungi using Blancophor® preparation, and cultured. In addition to conventional diagnostics, PCR (polymerase chain reaction) for detection of dermatophyte DNA was employed. This PCR-Elisa assay is based on the use of specific primers which target the topoisomerase II gene. This allows the highly specific molecular identification of *Trichophyton* (*T. rubrum*, *T. interdigitale*, and *Epidermophyton floccosum*) directly in clinical samples.

Results. 23.9% of patients were culture-positive for dermatophytes (either *T. rubrum*, or *T. interdigitale*). With PCR, dermatophyte DNA either of *T. rubrum* or *T. interdigitale*

could be detected in nail samples and skin scrapings from at least 29.9% of all patients. *Epidermophyton floccosum* was not found in this study, neither by cultivation nor by PCR. The diagnostic sensitivity of the PCR-Elisa assay was calculated as 79.0%; the diagnostic specificity as 85.5%.

Conclusion. PCR-Elisa evaluation makes possible a rapid, specific and sensitive diagnosis of dermatophytosis of the nails and skin within 24 (maximal 48) hours with identification of the involved species.

Keywords

Trichophyton rubrum · *Trichophyton interdigitale* · Diagnostic sensitivity · Diagnostic specificity · Dermatophytosis

Tab. 2 Kultureller Nachweis der Dermatophyten mittels Kultur und PCR, bezogen auf die Patienten, unabhängig vom Untersuchungsmaterial (n=218 Patienten)

	Kultur		PCR	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Kein Nachweis	166	76,1	153	70,1
Dermatophyten	52	23,9	65	29,9
Davon				
<i>Trichophyton interdigitale</i>	13	6,0	23	10,6
<i>Trichophyton rubrum</i>	39	17,9	42	19,3

Tab. 3 Vergleich der Ergebnisse des Pilznachweises mittels Blancophor®-Präparat, Kultur und PCR auf Dermatophyten-DNS, bezogen auf das Untersuchungsmaterial (Hautschuppen und Nagelspäne, n=218 Patienten)

	Blancophor®-Präparat		Kultureller Nachweis von Dermatophyten		PCR auf Dermatophyten-DNS	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Hautschuppen	54	24,8	34	15,6	47	21,6
Nagelspäne	58	26,6	21	9,6	43	19,7

die positive Reaktion an. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgt bei einer Wellenlänge von 405 nm (Photometer TECAN Sunrise, Crailsheim). Der Uni-plex-PCR-ELISA-Test erfasst separat *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *E. floccosum*.

Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels t-Test, Korrelationen wurden über die χ^2 -Methode berechnet und als ROC („receiver operating characteristic“-Kurven dargestellt. Außerdem wurden die diagnostische Spezifität und diagnostische Sensitivität des Verfahrens berechnet.

Ergebnisse

Patienten

Von den 218 Patienten waren 111 männlich und 107 weiblich. Die Mehrzahl der Patienten hatte das 5. Lebensjahrzehnt erreicht, Kinder waren nicht dabei. Das Durchschnittsalter der männlichen Patienten lag bei 58,1 Jahren und das der weiblichen bei 60,9 Jahren. Der Altersunterschied zwischen den Geschlechtern war nicht signifikant. Es handelte sich um Patienten einer chirurgischen Praxisklinik, die disponierende Faktoren und Erkrankungen für Fuß- und Nagelpilzinfektionen aufwiesen. Insgesamt 11,9% der Patienten waren Diabetiker bzw. hatten ein diabetisches Fußsyndrom. Von den in die

Studie einbezogenen 218 Patienten hatten 199 vor der Probeentnahme keinerlei antimykotische Therapie erfahren. Drei Patienten hatten sich einer systemischen antimykotischen Therapie mit Terbinafin 250 mg unterzogen. Zwischen der letzten lokalen oder oralen Behandlung und der Probeentnahme lag in jedem Fall ein Mindestabstand von 4 Wochen. Insgesamt waren 19 Patienten vorab lokal und/oder systemisch antimykotisch vorbehandelt.

Fluoreszenzoptischer Nachweis von Pilzelementen mittels Blancophor®-Präparat

Aus Hautschuppen ließen sich bei 24,8% der Patienten Pilzmyzel und/oder Pilzsporen nachweisen. Für Nagelspäne ergab sich ein ähnliches Bild mit 26,6%.

Kultureller Dermatophyten-nachweis aus Nagelmaterial und Hautschuppen

Aus den 218 untersuchten Proben von Hautschuppen und Nagelspänen (gleichzeitiger Nachweis bei einem Patienten wurde als ein Ereignis gewertet) ließen sich *T. rubrum* bei 39 Patienten (17,9%) und *T. interdigitale* in 13 Fällen (6%) in der Kultur isolieren (■ Tab. 2). In 166 Fällen (76,1%) erfolgte kein Nachweis. *E. floccosum* fand sich kulturell überhaupt nicht.

Mykologische Begleitflora

In Hautschuppen waren bei insgesamt 16% aller Proben Sprosspilze nachweisbar. Der apathogene Hefepilz *Rhodotorula* spp. wurde am häufigsten isoliert (54%), gefolgt von *Candida* spp. (an erster Stelle *Candida parapsilosis*) mit 34%. Bei 24% der Patienten ließen sich aus Hautschuppen Schimmelpilze isolieren, dominiert von *Penicillium* spp. (40% aller Schimmelpilze).

Die Nachweisrate von Sprosspilzen in Nagelspänen war halb so hoch wie in Hautschuppen. Hinsichtlich der Verteilung der einzelnen Spezies ergaben sich jedoch analoge Ergebnisse. In 56% der Fälle trat *Rhodotorula* spp. allein oder vergesellschaftet mit anderen Sprosspilzen auf. Wiederum war *Candida parapsilosis* mit 7 Nachweisen (39%) die häufigste *Candida*-Spezies. Die begleitende Schimmelpilzflora in Nagelspänen und Hautschuppen zeigte eine ähnliche Verteilung, mehrheitlich war *Alternaria* spp. allein oder vergesellschaftet mit anderen Schimmelpilzen, u. a. *Penicillium* spp., nachweisbar. *Scopulariopsis brevicaulis* ließ sich bei insgesamt 4 Patienten aus Nagelspänen isolieren.

Ergebnisse der Untersuchung auf Dermatophyten-DNS mittels PCR

Mit der PCR konnten aus den untersuchten Hautschuppen und Nagelspänen aller in die klinische Studie einbezogenen Patienten in 42 Fällen (19,3%) *T. rubrum* und in 23 Fällen (10,6%) *T. interdigitale* nachgewiesen werden (■ Tab. 2). Bei 153 Patienten (70,1%) war keine der beiden Spezies mit der PCR bestimmbar. In keinem Fall waren *T. rubrum* und *T. interdigitale* gleichzeitig nachweisbar. *E. floccosum* wurde nicht gefunden.

Bezogen auf das Untersuchungsmaterial erwies sich das Blancophor®-Präparat als am empfindlichsten, gefolgt von der PCR und erst danach von der Kultur (■ Tab. 3). Die vergleichsweise hohe Rate an positiven Nativpräparaten (24,8% bei Hautschuppen und 26,6% bei Nagelspänen) beruht darauf, dass neben Dermatophyten auch Spross- und Schimmelpilze zu einem reaktiven Blancophor®-Präparat führen. Die Nachweisrate für Der-

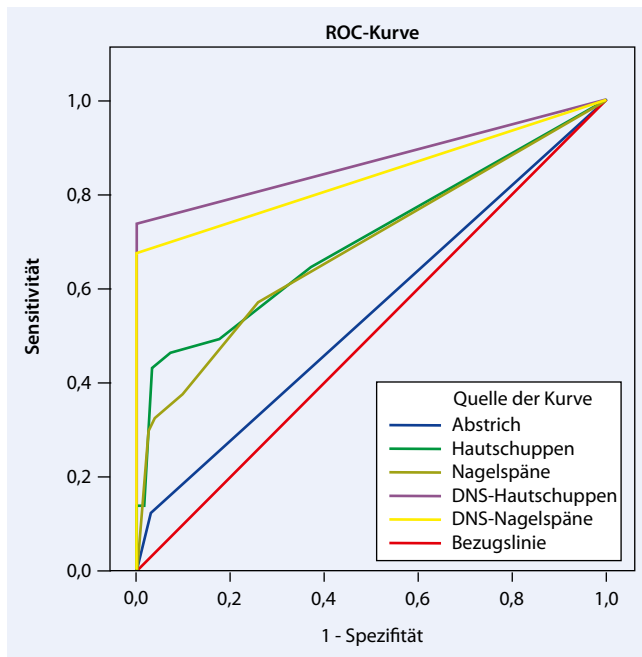


Abb. 1 ◀ Diagnostische Spezifität und diagnostische Sensitivität des Dermatophytennachweises mittels Kultur und PCR (ROC-Kurve). (Mit freundl. Genehmigung P. Nenoff)

matophyten mittels PCR (21,6% bei Hautschuppen und 19,7% bei Nagelspänen) ist im Vergleich zur Kultur (15,6% bei Hautschuppen und 9,6% bei Nagelspänen) wesentlich höher (■ Tab. 3).

Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Als richtig positiv bzw. richtig negativ gingen diejenigen Ergebnisse in die Berechnung ein, die mit der Kultur und der PCR übereinstimmend ermittelt wurden. Als falsch negativ wurden Befunde gewertet, die kulturell positiv, in der PCR aber negativ waren. Als falsch positiv wurden Befunde gewertet, die kulturell negativ, aber in der PCR positiv waren. Daraus ergeben sich die folgenden Zahlen: richtig negativ 142, richtig positiv 41, falsch negativ 11 und falsch positiv 24. Die aus diesen Werten kalkulierte diagnostische Spezifität der PCR – bezogen auf den Dermatophytennachweis gesamt – beträgt 85,5%, die diagnostische Sensitivität der PCR im Vergleich zur kulturellen Methode liegt bei 79,0%.

Ein alternativer Berechnungsansatz, bei dem nicht nur die kulturell nachgewiesenen Dermatophyten, sondern auch die in der PCR positiven als richtig positiv angesehen werden, ergab sogar eine Sensitivität von 85,5% und Spezifität der PCR von 100%.

„Receiver-operating-characteristic-Kurven“

Für die Berechnung bzw. statistische Verdeutlichung der Zuverlässigkeit des jeweiligen Nachweisverfahrens wurden die diagnostische Spezifität und diagnostische Sensitivität in einem Diagramm in Form sog. „Receiver-operating-characteristic-Kurven“ (ROC-Kurven) dargestellt. Der Abszissenwert stellt dabei die Spezifität, der Ordinatenwert die Sensitivität dar (aufgetragen nicht mit einem Prozentwert, sondern mit einem Wert zwischen 0 und 1). Die Fläche (ein Wert zwischen 0,500 und 1,000) unter der Kurve gilt als Maß für die Leistungsfähigkeit des Laborverfahrens. Je größer die Fläche ist, desto größer ist die Sensitivität des Verfahrens.

Mittels ROC ließ sich eine höhere diagnostische Sensitivität und Spezifität für die PCR (gelbe und violette Kurve) gegenüber dem kulturellen Nachweis der Dermatophyten (graue und grüne Kurve), unabhängig vom entnommenen Probematerial, nachweisen (■ Abb. 1). Spezifität und Sensitivität waren bei Hautschuppen noch etwas höher, wenn mit Nagelspänen verglichen wird. Die Fläche unterhalb aller 4 Kurven (gelb, violett, grau, grün) bis zur Bezugslinie (rot) belegt den gleichermaßen hohen Aussagewert beider Nachweisverfahren (PCR und Kultur).

Diskussion

Die konventionelle mykologische Diagnostik mit Kalilaugenpräparat weist eine ungenügende diagnostische Empfindlichkeit auf (35–80%), der kulturelle Pilznachweis versagt auch häufig (Empfindlichkeit ca. 50–80% bei Onychomykosen; [17, 18]). Neue molekulare Methoden sollen die „diagnostische Lücke“ schließen und die Effektivität der mykologischen Diagnostik erhöhen. In den letzten Jahren wurden molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Dermatophyten aus Nagelmaterial sowie Hautschuppen etabliert [9, 10, 12]. Eine Gensonde zum Nachweis von *T. rubrum* aus Nagelmaterial wurde bereits 1999 entwickelt [7].

Die am häufigsten eingesetzte Methode ist jedoch die PCR. Dafür wird DNS aus Nagelmaterial sowie Hautschuppen extrahiert und mittels spezifischer Primer amplifiziert. Die Detektion der amplifizierten DNS erfolgt entweder mittels Agarose-Gel-Elektrophorese oder alternativ, wie hier, mit einer Sonden-gestützten ELISA-Technik. Der molekularbiologische Dermatophytennachweis direkt aus dem Nagelmaterial erlaubt eine Sofortdiagnostik innerhalb von 24 h, eine Multiplex-PCR zum Nachweis von *T. rubrum*-DNS sowie weiteren Dermatophyten (Pan-Dermatophyten-Primer) ermöglicht sogar eine 5-h-Diagnostik [5, 6, 8].

Im hier eingesetzten PCR-ELISA-Test wurde das Topoisomerase-II-Gen als spezifische Sequenz für die Primer (Oligonukleotid als Startpunkt für die PCR) genutzt. Die DNS-Isolierung erfolgte mit dem Qiagen QIAamp DNA Mini Kit 250 von Roche®. Einer der beiden Primer ist Digoxigenin-markiert. Nach Amplifikation wird das PCR-Produkt zur Visualisierung mittels biotinylierter Sonde hybridisiert, dann an eine Streptavidin-beschichtete Festphase gebunden. Nach Zugabe eines Peroxidase-konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers sowie eines Substrates zeigt die Farbentwicklung im ELISA die positive Reaktion an. Der Uniplex-PCR-ELISA-Test erfasst separat *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *E. floccosum*.

Im Vergleich mit dem Standardverfahren, der kulturellen Anzüchtung („Gold-

standard“), betrug die diagnostische Spezifität der PCR 85,5%, die diagnostische Sensitivität lag bei 79,0%, bezogen auf den Dermatophytennachweis insgesamt. Diese Werte bestätigen die sehr gute allgemeine Vorhersagekraft der PCR im Vergleich mit dem bisherigen Standardverfahren. Die genannte Relation drückt sich in den Einzelnachweisraten wie folgt aus: Unabhängig vom Erreger und unabhängig von der Art der Proben war die Nachweis Häufigkeit mittels PCR im Vergleich zum kulturellen Nachweis höher. Die kulturellen Befunde zeigten bei 23,9% der Patienten ein positives Ergebnis, mit der PCR konnte der Erregernachweis bei 29,9% der Untersuchten geführt werden.

Auch erregerspezifisch erbrachte die PCR höhere Nachweisraten sowohl für *T. rubrum* als auch für *T. interdigitale*. Für *T. rubrum* war die Übereinstimmung der Ergebnisse (PCR und Kultur) höher als für *T. interdigitale* (■ Tab. 2). Sowohl mit kulturellem Nachweis (39 Patienten) als auch mit PCR (42 Patienten) war *T. rubrum* häufiger nachweisbar als *T. interdigitale* (13 bzw. 23 Patienten). *E. floccosum* wurde in keinem Fall nachgewiesen, was als indirekte Bestätigung der Zuverlässigkeit beider Verfahren gelten kann.

Die amplifizierten Fragmentlängen sind mit 907 bp (*T. rubrum*) und 1330 bp (*E. floccosum*) sehr lang. Um sicherzustellen, dass DNS in ausreichender Qualität extrahiert wurde, um bei dieser Fragmentlänge, insbesondere für *E. floccosum*, eine Amplifizierung zu gewährleisten, sind Kontrollen erfolgt. Für alle 3 untersuchten Dermatophyten kamen Positivkontrollen zur Anwendung. Dafür wurde DNS aus Koloniematerial aller 3 Dermatophyten extrahiert, mit den spezifischen Sonden amplifiziert und letztlich auch noch mittels Sequenzierung bestätigt, dass es sich um die jeweils richtige Spezies handelt.

Brasch et al. [4] führten Untersuchungen mittels PCR in 464 Schuppen- und 230 Nagelproben durch. Sie setzten zum Nachweis von *T. rubrum*-Primersequenzen der ITS-Region ein (TGGTCTGGCCTTGACTGACC und GTAAGGATGGCTAGTTAGGGGG; Sequenzen 5' bis 3'). Von den Hautschuppen waren 16% sowohl mittels Kultur und PCR positiv für *T. rubrum*, 9% nur in der

PCR und 3% nur in der Kultur. Dagegen war das Kalilauge (Kaliumhydroxid)-Präparat nur bei 5% der Proben reaktiv. Für Nägel fanden sich folgende Werte: 17% Kultur und PCR positiv, 20% PCR positiv, 3% Kultur positiv und 7% KOH positiv. Letztlich führte die PCR also zu einer höheren Positivrate der mykologischen Diagnostik.

Beifuss et al. [2] wiesen bei 163 (79,9%) von 204 KOH-positiven Haut- und Nagelproben mit der PCR-ELISA-Methode Dermatophyten-DNS nach. Zielsequenz des eingesetzten Primer-Paares war auch hier das Topoisomerase-II-Gen der Dermatophyten-Spezies. Die Kultur auf Dermatophyten war dagegen bei nur 59,8% der Proben positiv. Beide Methoden – PCR und Kultur – unterschieden sich signifikant (McNemar-Test, $p < 0,005$); 316 konsekutiv gewonnene Haut- und Nagelproben einer Hautarztpraxis waren mittels PCR-ELISA auf Dermatophyten in 25% positiv, der kulturelle Erregernachweis war dagegen bei nur 7,3% positiv.

In einer eigenen prospektiven Untersuchung über 32 Monate fanden sich bei 34,7% der 14.891 getesteten Hautschuppen und Nagelspäne Dermatophyten mittels kulturellem Nachweis und/oder Dermatophyten-PCR; 3437 (66,5%) waren Kultur- und PCR-positiv, 682 (13,2%) Kultur-positiv, jedoch PCR-negativ, und in 1054 Proben (20,4%) war die Kultur negativ, trotzdem ließ sich mit PCR ein Dermatophyt nachweisen. Folgende Aufteilung der Dermatophyten fand sich: 73,6% *T. rubrum*, 25,6% *T. interdigitale*, 0,65% *Microsporum canis* und 0,15% *E. floccosum* [25].

Brillowska-Dabrowska et al. [5] publizierten 2007 eine Studie mit Ergebnissen aus 118 Nagelproben, die im Rahmen der Routinediagnostik untersucht und mit einer PCR verglichen wurden. Es fand sich eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse der konventionellen Diagnostik und der PCR. Die Autoren dieser Studie schlussfolgerten, dass die PCR nicht nur die Schnelligkeit der Diagnostik, sondern auch die Empfindlichkeit des Nachweises der Erreger der Nagelpilzinfektion deutlich verbessert.

Verrier et al. [26] nutzten einen „Polymerase Chain Reaction-Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism“

(PCR-TRFLP)-Assay zum direkten Nachweis von Dermatophyten und sog. Nicht-Dermatophyten-Schimmelpilzen [“non-dermatophyte-moulds“ (NDM), also Schimmelpilze] aus Nagelmaterial. Mit dem Multiplex-PCR-Ansatz ließen sich gleichzeitig *Trichophyton* spp. und 12 weitere NDM nachweisen. Bei 74% der Patienten fand sich mit der PCR ein Erreger, während die Kultur negativ blieb.

Ähnliche Resultate erzielten Luk et al. [16] aus Hongkong mit einer Dermatophyten-PCR zum Nachweis von *T. rubrum* und *T. interdigitale* bei 120 Patienten mit Onychomykose. KOH-Präparat, Kultur und PCR hatten Positivraten von 29,2, 10 bzw. 40%. Nur 2 Kultur-positive Proben wurden mittels PCR nicht identifiziert, wohingegen die PCR in 38 Nagelproben, die kulturell negativ waren, einen Erreger erbrachte. Die Autoren dieser Studie ziehen den Schluss, dass die PCR im Vergleich zum KOH-Präparat und zur Kultur eine höhere Positiv- und eine niedrigere Negativrate hat. Die Dermatophyten-PCR wird auch von ihnen als zusätzliche diagnostische Methode zum Erregernachweis bei Onychomykose empfohlen.

Der PCR-ELISA-Test erlaubt – ebenso wie die konventionelle Kultur, aber im Gegensatz zur mikroskopischen Untersuchung – die Identifizierung des Dermatophyten bis zur Speziesebene. Eine PCR-Dermatophyten-diagnostik führt darüber hinaus – ein Vorteil gegenüber der Kultur – unabhängig von morphologischen Veränderungen und den Entwicklungsstadien der Erreger zu richtigen Ergebnissen. Ein weiterer Vorteil der PCR ist, dass nur eine geringe Menge an DNS (und damit an Probematerial) benötigt wird.

Die PCR kann im Gegensatz zur Kultur jedoch nicht zwischen avitalem Genom und vitalen Dermatophyten differenzieren, da jegliche DNS amplifiziert wird, die vorhanden ist. Durch die hohe diagnostische Sensitivität der PCR ist darüber hinaus eine erhöhte Störanfälligkeit gegeben, Kontrollen sind daher notwendig. Mittlerweile sind weitere Primer etabliert worden und befinden sich bereits in der mykologischen Routinediagnostik im Einsatz. Das betrifft *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton* species von *Arthroderma benhamiae* und neuerdings *T. verrucosum*.

Die Dermatophyten-PCR verkürzt den Zeitpunkt bis zur Diagnosestellung erheblich (von etwa 4 Wochen beim kulturellen Nachweis auf 1 Tag). Mittels PCR kann so unmittelbar die Indikation für eine antimykotische Therapie gestellt werden. Auch für die Therapiekontrolle ist die PCR eine bestens geeignete Methode. Jensen und Arendrup [14] postulierten ganz aktuell, dass die molekularen Methoden zum Dermatophytennachweis die etablierten klassischen Dermatophyten-detectionsverfahren ergänzen, evtl. sogar ersetzt werden. Möglicherweise erlauben andere Primer, die z. B. die Mikrosatellitensequenz von *T. rubrum* erkennen, eine höhere Empfindlichkeit des Nachweises [22]. Erwähnt werden soll auch der neue Ansatz einer Multiplex-PCR, mit der gleichzeitig verschiedene Dermatophyten-Spezies nachgewiesen werden können [15]. Prinzipiell scheint auch die Realtime-PCR am Lightcycler ein Erfolg versprechender Ansatz zum Nachweis von Dermatophyten zu sein [3].

Fazit für die Praxis

- Die PCR auf Dermatophyten ergänzt die klassische dermatomykologische Diagnostik – Nativpräparat und Kultur. Der Anteil positiver Ergebnisse wird erhöht, die Zeit bis zur Diagnosestellung wesentlich verkürzt.
- Die molekularbiologische Methode ist wirtschaftlich in Bezug auf die Investitionskosten und Verbrauchsmaterialien, nur der relativ hohe Personalaufwand ist limitierend.
- Mittelfristig muss davon ausgegangen werden, dass molekulare Techniken die konventionellen Methoden in der Dermatomykologie ablösen.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. P. Nenoff

Haut- und Laborarzt/Allergologie, Andrologie, Labor für medizinische Mikrobiologie, Partnerschaft Prof. Dr. med. Pietro Nenoff & Dr. med. Constanze Krüger
 Straße des Friedens 8,
 04589 Mölbis
 nenoff@mykologie-experten.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt für sich und seine Koautoren an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Arabatzis M, Bruijnesteijn Coppenraet LES von, Kuijper EJ et al (2007) Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *Br J Dermatol* 157:681–689
2. Beifuß B, Bezold G, Gottlöber P et al (2011) 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* 54:137–145
3. Berk E, Kuştimur S, Kalkancı A, Ozaş OM (2011) DNA extraction and identification of *Trichophyton rubrum* by real-time polymerase chain reaction from direct nail scraping specimens of patients with onychomycosis. *Mikrobiyol Bul* 45:150–158
4. Brasch J, Beck-Jendroschek V, Gläser R (2011) Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* in superficial tinea and onychomycosis by use of a direct polymerase chain reaction assay. *Mycoses* 54:e313–e317
5. Brillowska-Dabrowska A, Saunte DM, Arendrup MC (2007) Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* 45:1200–1204
6. Brillowska-Dabrowska A, Søgaard Nielsen S, Vedel Nielsen H, Cavling Arendrup M (2010) Optimized 5-hour multiplex PCR test for the detection of tinea unguium: performance in a routine PCR laboratory. *Med Mycol* 48:828–831
7. El Fari M, Tietz H-J, Presber W et al (1999) Development of an oligonucleotide probe specific for *Trichophyton rubrum*. *Br J Dermatol* 141:240–245
8. Garg J, Tilak R, Singh S et al (2007) Evaluation of pan-dermatophyte nested PCR in diagnosis of onychomycosis. *J Clin Microbiol* 45:3443–3445
9. Gupta AK, Zaman M, Singh J (2007) Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* DNA from the nail samples of patients with onychomycosis by a double-round polymerase chain reaction-based assay. *Br J Dermatol* 157:698–703
10. Gutzmer R, Mommert S, Kuttler U et al (2004) Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 53:1207–1214
11. Heidemann S, Monod M, Gräser Y (2010) Signature polymorphisms in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic and anthropophilic strains of *Trichophyton interdigitale* and other species of *T. mentagrophytes* sensu lato. *Br J Dermatol* 162:282–295
12. Hryniewicz-Gwóźdź A, Jagielski T, Dobrowolska A et al (2011) Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates using PCR-RFLP and RAPD methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30:727–731
13. Hsu MC, Chen KW, Lo HJ et al (2003) Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 52:1071–1076
14. Jensen RH, Arendrup MC (2012) Molecular diagnosis of dermatophyte infections. *J Inf Dis* 25:126–134
15. Li XF, Tian W, Wang H et al (2011) Direct detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis by multiplex polymerase chain reaction-based assay. *Eur J Dermatol* 21:37–42
16. Luk NM, Hui M, Cheng TS et al (2012) Evaluation of PCR for the diagnosis of dermatophytes in nail specimens from patients with suspected onychomycosis. *Clin Exp Dermatol* 37:230–234
17. Mügge C, Haustein UF, Nenoff P (2006) Onychomykosen – eine retrospektive Studie zum Erregerspektrum. *J Dtsch Dermatol Ges* 4:218–228
18. Nenoff P, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ (2012) Onychomykose – ein Update Teil 2 – Vom Erreger zur Diagnose – konventionelle und molekularbiologische mykologische Diagnostik. *Hautarzt* 63:130–138
19. Nenoff P, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ (2012) Onychomykose – ein Update. Teil 1 – Prävalenz, Epidemiologie, disponierende Faktoren und Differenzialdiagnose. *Hautarzt* 63:30–38
20. Nenoff P, Krüger C (2012) Dermatophyten-Infektionen der Haut, Haare und Nägel – mykologische Diagnostik und Therapie – ein Update, Teil 2. *Akt Dermatol* 38:432–441
21. Nenoff P, Krüger C (2012) Dermatophyten-Infektionen der Haut, Haare und Nägel – klinische Aspekte – ein Update, Teil 1. *Akt Dermatol* 38:347–359
22. Pankewitz F, Nenoff P, Uhrhlaß U et al (2013) Development of a high sensitive PCR ELISA assay to diagnose the most prevalent agent of onychomycosis and comparison with an already established assay. *Br J Dermatol* [Epub ahead of print]
23. Tchernev G, Penev P, Nenoff P et al (2013) Onychomycosis – modern diagnostic and treatment approaches. *WMW Wien Med Wochenschr* 163(1–2):1–12
24. Tsuboi R, Okeke CN, Inoue A et al (2002) Identification and viability assessment of dermatophytes infecting nail based on quantitative PCR of dermatophyte actin (ACT) mRNA. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 43:91–93
25. Uhrhlaß S, Krüger C, Herrmann J et al (2011) Molekularbiologischer Direktnachweis von Dermatophyten mittels Polymerasekettenreaktion in der dermatomykologischen Routinediagnostik – eine prospektive Untersuchung über 32 Monate. *J Dtsch Dermatol Ges* 9(Suppl 1):226
26. Verrier J, Pronina M, Peter C et al (2012) Identification of infectious agents in onychomycoses by polymerase chain reaction – terminal restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 50:553–561
27. Winter I (2012) Der Stellenwert der molekularbiologischen Diagnostik von Fuß- und Nagelpilzinfektionen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Dermatophyten-DNS bei Patienten mit Ulzerationen unterschiedlicher Genese – eine prospektive Untersuchung. *Dissertationsschrift, Universität Leipzig*