

Labordiagnostik in der Dermatologie

Wissenschaftlich begründet, praxisrelevant und wirtschaftlich

PIETRO NENOFF¹, GUDRUN HAMM²

Die Labordiagnostik hat sich zu einem der wichtigsten und komplexesten Gebiete in der Dermatologie entwickelt. Das gilt für Qualitätssicherung, Resistenzprobleme und Pilzdiagnostik, besonders aber für die allergologischen Verfahren, wo die Fortschritte rasant verlaufen und kein Stein mehr dort liegt, wo er sich vor 20 Jahren befand. Der 8. Leipziger Labor-Workshop hat dies erneut bestätigt.

Seit dem 1. April 2008 ist die neue „Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung labormedizinischer Untersuchungen“ in Kraft. Sie beschränkt sich nicht nur auf quantitative Analysen, sondern gilt für alle Laboruntersuchungen. Einige besonders wichtige Aspekte erläuterte Dr. Friedrich Brune,

Magdeburg. Für die Praxis sind von den sieben Kapiteln (Kapitel A bis G), so Brune, vor allem die Kapitel A und B wichtig, auch wenn in einer Übergangszeit von zwei Jahren intern und extern nach der alten Richtlinie gearbeitet wird. Ringversuche werden allerdings ab 1. Januar 2009 nach der neuen Rili-BÄK bewertet.

Kapitel A gilt für ausnahmslos alle Laboruntersuchungen. Dieser Teil verlangt neben prä- und postanalytischen Prozessen das genaue Beschreiben aller Laborprozes-

se und ein detailliertes Qualitätsmanagementsystem, das u. a. für jede Laboruntersuchung eine genaue Verfahrensanweisung umfasst. In Kapitel B werden die speziellen Laboruntersuchungen behandelt. Bislang ist allerdings erst Teil B1 (Qualitätskontrolle quantitativer Untersuchungen) erschienen, der quantitative Laboruntersuchungen enthält. In nachfolgenden Teilen (B2 bis Bx) werden weitere spezielle Untersuchungen folgen (beispielsweise qualitative Untersuchungen, Untersuchungen von Krankheitserregern u. a.).

Die Qualitätskontrolle quantitativer Untersuchungen (B 1) wurde komplett überarbeitet. Die interne Qualitätskontrolle ist nun für alle quantitativen Untersuchungen verbindlich. Definiert wurden die zulässigen Fehlergrenzen, dargelegt in Tabelle B1 a–c des Kapitels B1. Zentrale Begriffe bei der internen Qualitätskontrolle sind die relative Messabweichung

¹ Laboratorium für medizinische Mikrobiologie, Straße des Friedens 8, D-04579 Mölbitz

² Hautarztpraxis Halle, Kleinschmieden 6, D-06108 Halle (Saale)



Foto: J.G. Hamm

PCR-Arbeitsplatz zum Nachweis von Dermatophyten-DNS aus Hautschuppen und Nagelspänen: Zentrifuge, Thermoschüttler und Thermocycler als Minimalausstattung.

und der quadratische Mittelwert der Messabweichung. Neu ist, dass diese Abweichungen aus jedem Kontrollwert und dem Zielwert der Kontrolle errechnet werden. Daher hat der Zielwert der Kontrollprobe eine eminente Bedeutung.

Von der neuen Rili-BÄK werden solche Geräte favorisiert, die Unit-Use-Reagenzien verwenden. Das sind Reagenzsysteme, die mit einer Untersuchung verbraucht sind. Außerdem sollen diese Geräte physikalische oder elektronische Standards anwenden und so – oder durch eine andere integrierte Prüfung der Gerätefunktion – verhindern, dass fehlerhafte Messergebnisse ausgegeben werden können. Nur unter diesen Voraussetzungen ist die vereinfachte Qualitätskontrolle im bisherigen Umfang ausreichend.

Die externe Qualitätskontrolle durch Ringversuche ist künftig für alle quantitativen Untersuchungen verbindlich, die in der Tabelle B1 a–c aufgeführt sind, wobei wie bisher ein Ringversuch pro Quartal gefordert wird.

Hygienestandards in der Praxis

Gleichbleibend aktuell sei das Thema der Hygienestandards, so Dr. Silvia Fanghänel, Halle/Saale, besonders da die multiresistenten Erreger, wie MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) und ESBL (Extended Spectrum Beta-Laktamase) sich flächendeckend weiter ausbreiten und zunehmend auch im ambulanten Bereich anzutreffen sind. Das Robert-Koch-Institut hat daher für die Vorgehensweise in der Praxis eine Empfehlung für den Umgang mit MRSA-Patienten herausgegeben. Hier die wesentlichen Aspekte:

- Kontakte von MRSA-Patienten zu anderen Patienten minimieren oder verhindern.
- Voraussetzungen zur optimalen Händehygiene schaffen.
- Nur unmittelbar benötigte Materialien und Geräte zur Behandlung von MRSA-Patienten offen bereitstellen, damit bewegen sich die anschließend notwendigen Desinfektionsmaßnahmen in einem vertretbaren Rahmen.
- Desinfektion der Kontaktflächen nach Behandlungsende.
- Patienten, die in einer Sanierungsphase sind, ausreichend über alle notwendigen begleitenden Maßnahmen, wie täglichen kompletten Wäschewechsel, informieren, um eine Rekolonisierung zu verhindern.
- Information an weiterbehandelnde Ärzte.

Die gleichen Aspekte treffen auch beim Umgang mit ESBL-Patienten zu. Ein wesentlicher Unterschied zwischen MRSA- und ESBL-Patienten besteht darin, dass es für ESBL-Patienten keine Möglichkeit der Sanierung gibt. Eine ESBL-Infektion muss mit den wenigen zur Verfügung stehenden wirksamen Antibiotika therapiert werden. Im Falle einer Besiedlung könnten nur adäquate Hygienemaßnahmen in der Arztpraxis die Entstehung von Infektketten verhindern, so Fanghänel.

Allergologische In-vitro-Diagnostik: Auswirkungen auf die Hautarztpraxis?

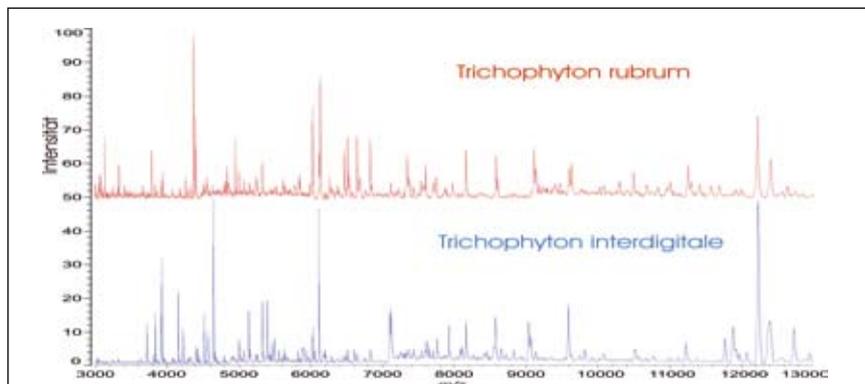
In den vergangenen 20 Jahren ist ein enormer Fortschritt bei der Entdeckung neuer Allergene zu verzeichnen, wie PD Dr. med. Jörg Kleine-Tebbe, Berlin, erklärte. Parallel zur Allergenforschung wurden zunehmend diagnostische Systeme in kleineren Dimensionen entwickelt. So können mit Hilfe

sogenannter Microarrays über 100 Allergene nach dem Prinzip herkömmlicher Immunassays zur IgE-Bestimmung auf einem Quadratcentimeter getestet werden. Nach Bindung des spezifischen IgE wird dieses durch markierte Anti-IgE-Antikörper mit Hilfe eines Laser-Scanners erfasst und semiquantitativ ausgewertet. Durch die zusätzlichen, seit 2008 eingeführten und klinisch bereits gut charakterisierten Einzelallergene wird die diagnostische Qualität deutlich aufgewertet, wenngleich die derzeitige Zusammensetzung des Microarrays (ImmunoCAP ISAC®, www.vbc-genomics.at) noch nicht alle Allergenquellen beinhaltet, die in der Routine z. B. mit Hauttests geprüft werden können.

Hinsichtlich der zugrunde liegenden analytischen Empfindlichkeit und Übereinstimmung mit anderen Immunoassays seien die Daten vielversprechend, so Kleine-Tebbe, obwohl die Reproduzierbarkeit (Abweichungen zwischen wiederholten Messungen: ImmunoCAP-ISAC®-Variationskoeffizienten [VK] zwischen 10 und 20%) nicht das niedrige Niveau etablierter Immunassays erreicht (z. B. Phadia ImmunoCAP, VK < 10%). Vorläufige Vergleichsuntersuchungen mit anderen diagnostischen Methoden zeigten für bestimmte Allergenquellen (Birken- und Gräserpollen, Katzenepithelien) aber gute Übereinstimmung, für andere mäßige (Hausstaubmilben) bzw. manche Allergenquellen (Beifußpollen) möglicherweise aufgrund fehlender Allergenkomponenten eine unzureichende Assoziation.

Innerhalb der nächsten Jahre würden sicherlich die bestehenden Lücken im Allergenspektrum durch Nachklonierung der verantwortlichen Allergen-Proteine geschlossen werden, vermutet Kleine-Tebbe. Bei einer Auswertung von global gesammelten klinischen Daten in Verbindung mit den diagnostischen Resultaten wird sich möglicherweise die klinische Charakterisierung der neuen Protein-Allergene unter Zuhilfenahme geeigneter Datenbanken enorm beschleunigen lassen.

Damit steht die Allergie-Diagnostik vor neuen Herausforderungen. Wurden bisher nach einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung der betroffenen Allergiker ein Screening mit Hilfe von Prick-Hauttests vorgenommen



MALDI-TOF-Massenspektren von *Trichophyton rubrum* und *Trichophyton interdigitale*, Identifizierung von 7 Tage alten Kulturen auf Sabouraud 4 %-Glukose-Agar.

Foto: G. Hamm, Halle

und die spezifische IgE-Bestimmung als In-vitro-Methode gezielt eingesetzt – und in Zweifelsfällen zur Klärung der klinischen Relevanz Provokations-Methoden bemüht –, ist künftig ein anderes Vorgehen denkbar: Nach einem Massenscreening auf die wichtigsten Soforttyp-Allergenkomponenten aus verschiedenen Quellen (Aero- und Nahrungsmittel-Allergene, Insektengift-Allergene) könnte eine anschließende, gründliche Anamnese die klinische Relevanz der erhobenen Sensibilisierungen prüfen. Ein Hauttest wäre nur noch für Allergenquellen (Extrakte) erforderlich, die nicht mit Hilfe eines IgE-Screenings erfasst werden können oder deren kutane Sensibilisierung zusätzlich notwendige, diagnostische Informationen verspricht. Provokationen würden aber weiterhin zur klinischen Relevanzprüfung ihre Berechtigung behalten.

Potenziell könnte eine derartige Diagnostik breit gefächerte, individuelle Sensibilisierungsmuster erfassen, spezielle Risiko-Moleküle identifizieren und bei unvermuteten, spezifischen IgE-Ergebnissen möglicherweise die Aufklärung unklarer allergischer/anaphylaktischer Ereignisse beschleunigen. Auf der anderen Seite besteht die Gefahr, dass zahlreiche allergische Sensibilisierungen ohne korrespondierende Symptome, d. h. ohne klinische Relevanz, die Interpretation erschweren.

Für wen wäre diese neue Form einer molekularen Allergie-Diagnostik besonders interessant? Sicher sind polysensibilisierte Patienten mit wahrscheinlicher Beteiligung kreuzreaktiver Pan-Allergene, Nahrungsmittel-Allergiker mit komplexen Sensibilisierungsmustern, Betroffene mit

ungeklärten anaphylaktischen Reaktionen und Patienten mit ungewöhnlichen Sensibilisierungsmustern vielversprechende Kandidaten für diese neue Form der Allergie-Diagnostik, so Kleine-Tebbe. Bisher bildet sich dieser diagnostische Test aber nicht in den Ziffern der ärztlichen Gebührenordnungen ab. Die Ergebnisse der klinischen Evaluation würden darüber entscheiden, ob diese Form der „mikronisierten“ molekularen IgE-Diagnostik zukünftig ihr ganzes Potenzial entfalten kann, resümierte Kleine-Tebbe.

PCR zum Direktnachweis von Dermatophyten

Im Augenblick ist es die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), die die klassische Diagnostik – Nativpräparat und Kultur von Dermatophyten ergänzt und den Anteil positiver Ergebnisse erhöht. Sie kann auch heute schon die Zeit bis zur Diagnosestellung deutlich verkürzen. Die Methode sei wirtschaftlich in Bezug auf die Investitionskosten und Verbrauchsmaterialien, nur der relativ hohe Personalaufwand sei limitierend, erklärte Prof. Pietro Nenoff, Mölbis. Und die Qualität ist unbestritten. Er erläuterte dies anhand eigener Daten:

Zum Direktnachweis von Dermatophyten aus Nagelmaterial und Hautschuppen wurde ein PCR-ELISA eingesetzt. Als spezifische Sequenz für die Primer wurde das Topoisomerase-II-Gen genutzt und die DNS-Isolierung erfolgte mit dem Qiagen QIAamp DNA Mini Kit 250. Der Primer war Digoxigenin-markiert. Nach Amplifikation wurde das PCR-Produkt zur Visualisierung mittels biotinylierter Sonde hybridisiert, dann an eine Strepta-

vidin-beschichtete Festphase gebunden. Nach Zugabe eines Peroxidase-konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers sowie eines Substrates zeigte die Farbentwicklung im ELISA die positive Reaktion an. Der Uniplex-PCR-ELISA erfasste separat *Trichophyton (T.) rubrum*, *T. interdigitale* und *Epidermophyton floccosum* – auf diese drei Dermatophyten wurden Nagelspäne untersucht, Hautschuppen zusätzlich auf *Microsporum canis*-DNS.

Die PCR wurde mit der Empfindlichkeit des fluoreszenzoptischen Nativpräparates und der kulturellen Untersuchung verglichen. In einem Zeitraum von 10 Monaten wurden 3.664 Proben untersucht. Dermatophyten waren mittels Kultur und/oder PCR 1.414 Mal nachweisbar. 960 Proben (68%) waren Kultur- und PCR-positiv, 201 Proben (14%) waren Kultur-positiv, jedoch PCR-negativ. In 253 Proben (18%) war die Kultur negativ, trotzdem ließ sich mittels PCR ein Dermatophyt nachweisen.

Die diagnostische Empfindlichkeit des Calcofluor-Präparates betrug im Vergleich zur Kultur 80,1%, die Spezifität 80,6%. Die diagnostische Sensitivität der Kultur auf Dermatophyten lag bei 82,1%, die Spezifität – da es prinzipiell keine falsch-positiven Kulturergebnisse auf Dermatophyten geben kann – bei 100%. Mit 85,8% war die Sensitivität der PCR im Vergleich zur Kultur höher. Folgende Aufteilung der 1.414 Dermatophyten fand sich: 68,8% *T. rubrum*, 20,1% *T. interdigitale*, 0,8% *Epidermophyton floccosum*, 0,3% *Microsporum canis*.

Pilzdiagnostik mit MALDI-TOF MS

Die allgemeinen Trends der Mikrobiologie ermöglichen eine weitere Reduzierung der Analyse- und Wachstumszeiten der Erreger bei einer Qualitätserhöhung der Analyseergebnisse. Dieses Fazit zieht Dr. Marcel Erhard, Potsdam/Golm. Zu verdanken ist dies neben den PCR-basierenden Techniken einer neuen Methode: der MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry). Bei dieser Methode werden die Molekulargewichte der Zellkomponenten (meist Proteine) bestimmt. Allerdings ist derzeit eine direkte Analyse der Erreger aus Nagel- oder Hautmaterial noch nicht möglich. Sobald sich jedoch nach kurzer

Kultivierung des Erregers auf Nährböden sichtbares Myzel gebildet hat, kann die Analyse durchgeführt werden. Das Myzel, ca. 50–100µg, wird dafür vom Nährboden abgenommen und auf den MALDI-TOF-MS-Probenträger aufgetragen. In einem zweiten Schritt wird die Matrix, gelöst in einem organischen Lösungsmittel, hinzugegeben. Diese Matrixlösung dringt in die Pilzzellen ein und extrahiert die molekularen Bestandteile der Zelle. Während das Lösungsmittel verdunstet, bildet die Matrix Kristalle aus, in die auch Moleküle aus den Pilzzellen eingebaut werden. Mit Hilfe des MALDI-TOF MS erhält man dann nach nur ca. 30 Sekunden einen sog. Protein-Massen-Fingerprintabdruck der Probe. Bei Pilzen weisen die Massenspektren ca. 150 bis 200 Proteinmassen auf, die für den Vergleich mit Referenzspektren herangezogen werden können.

Die Massenspektren der Proben würden an die SARAMIS (Spectral ARchive And Microbial Identifikation System)-Software und -Datenbank übermittelt und ausgewertet, so Erhard weiter. Protein-Massen-Fingerprintabdrücke sind charakteristisch für einzelne Erregerspezies, wodurch alle Erreger identifiziert werden können, für die in der Datenbank Referenzspektren hinterlegt sind. Die MALDI-TOF-MS-Referenzspektren-Datenbank wird seit ca. 5 Jahren in einem großen Netzwerk von Partnern aufgebaut und deckt inzwischen alle typischen und relevanten Erreger ab. Erfolgt mit SARAMIS keine Identifizierung, handelt es sich im Allgemeinen um einen atypischen Vertreter einer Spezies oder um eine Spezies, für die noch kein Referenzspektrum vorliegt. Für viele Species ist auch eine Typisierung unterhalb der Spezies-Ebene möglich, zum Teil bis hin zur Unterscheidung von Stämmen, wodurch einzelne Epidemiestämme direkt identifiziert werden können. Noch ein Vorteil: Mit der SARAMIS-Datenbank werden automatisch die neuesten taxonomischen Begriffe und Einteilungen der Erreger verwendet.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. med. Pietro Nenoff

Laboratorium für medizinische
Mikrobiologie

Straße des Friedens 8, D-04579 Mölbis

E-Mail: nenoff@mykologie-experten.de