

6/2015 Dezember

C 14118

# *derm*

*Praktische Dermatologie*



**omnimed**  
[www.omnimedonline.de](http://www.omnimedonline.de)

# Direktnachweis von Dermatophyten-DNA mit PCR bei Nagelerkrankungen

Silke Uhrlaß<sup>1</sup>, Constanze Krüger<sup>1</sup>,  
G. Bezold<sup>2</sup>, P. Nenoff<sup>1</sup>

## Summary

### Background

The diagnosis of an onychomycosis should be verified by means of mycological laboratory proceedings using microscopic native specimen with fluorescence staining by Blancophor® preparation, and cultural detection of fungi. However, in addition to conventional diagnostic techniques, new molecular biological methods, in particular the polymerase chain reaction (PCR) for direct detection of dermatophyte DNA in nail samples, have been introduced in mycological routine diagnostics. Aim of the work: With a PCR-EIA using primers which are specific targeted against the gene of the topoisomerase II, the dermatophytes *Trichophyton (T.) rubrum*, *T. interdigitale*, and *Epidermophyton (E.) floccosum* should be detected directly in the clinical material.

### Patients and methods

In a 4-months-period, altogether 1,293 nail samples from patients with nail disorders were involved in this prospective study. Nail material was collected by drilling, curettage, or cutting. Each sample was investigated by Blancophor® preparation, culture, and uniplex PCR-Elisa-Assay (target: topoisomerase II gene) for detection of *T. rubrum*, *T. interdigitale*, and *E. floccosum*.

### Results

Culture was positive for dermatophytes in 389 (30%) of the nail samples. However, PCR revealed positive results in 43% (553 samples). With other words, the number of nail samples with positive PCR result was 48% higher than that of culture positive samples. 365 (94%) out of the 389 culture positive samples were PCR-positive, demonstrating a good correlation between culture and PCR. This is underlined by the fact that in few cases only, in 24 (6%) of the 389 samples, the constellation culture positive, and PCR negative was found. In addition, there was a good agreement between Blancophor® preparation, and results of the PCR. Positive preparation was found in 47% (610 out of 1,293) of the samples. A high amount, 446 (73%) out of these 610 Blancophor® positive samples were both PCR and culture positive. Further fungi, moulds and yeasts, have to be considered as cause for the remainder of positive preparations.

*T. rubrum* was the most frequent detected causative agent. Culture and/or PCR positive were 459 out of 1,293 samples, corresponding to 35.5%, followed by *T. interdigitale* with 118 positive samples, corresponding to 9.1%. *E. floccosum* was found in a single nail sample by PCR, exclusively.

### Conclusion

New molecular biological methods complete the conventional mycological diagnostics of onychomycosis, and increase the diagnostic sensitivity significantly. The dermatophyte-PCR presents a highly specific nucleic acid amplification technique for direct detection of the causative agent in the nail material.

### Keywords

Dermatomycoses, dermatophytoses, tinea pedis, onychomycoses, *Trichophyton rubrum*, Blancophor® preparation, mycological diagnostics, polymerase chain reaction, PCR, dermatophyte-DNA.

## Zusammenfassung

### Hintergrund

Die Diagnose einer Onychomykose sollte sich auf mykologische Laboruntersuchungen – das Nativpräparat als Kalilaugen- oder fluoreszenzoptisches Blancophor®-Präparat und die kulturelle Anzucht der Pilze – stützen. Neue molekularbiologische Methoden, insbesondere die Polymerasekettenreaktion (»polymerase chain reaction« [PCR]) zum Direktnachweis von Dermatophyten-DNA in Nagelproben wurden etabliert und sind heute zusätzlich zur konventionellen Diagnostik verfügbar.

### Ziel der Arbeit

Mit einem PCR-Enzymimmunoassay (EIA) unter Verwendung von »Primern«, die spezifisch gegen das Gen der Topoisomerase II gerichtet sind, sollten die Dermatophyten *Trichophyton (T.) rubrum*, *T. interdigitale* und *Epidermophyton (E.) floccosum* direkt im klinischen Material nachgewiesen werden.

### Patienten und Methoden

Im Rahmen einer prospektiven Studie zur molekularbiologischen Diagnostik der Onychomykose wurden in einem 4-Monats-Zeitraum 1.293 Nagelproben von Patienten mit Nagelveränderungen mit dem Blancophor®-Präpa-

<sup>1</sup> Labor für medizinische Mikrobiologie, Mölbis  
<sup>2</sup> Gemeinschaftspraxis Dermatologie, Neu-Ulm

rat sowie kulturell untersucht. Zusätzlich kam eine Uniplex-PCR als sogenannter PCR-EIA zum Nachweis von *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *E. floccosum* zur Anwendung.

### Ergebnisse

Die Kultur erbrachte Dermatophyten in 389 (30%) der Nagelproben. Dagegen war Dermatophyten-DNA mittels PCR in 553 Proben (43%) nachweisbar. Das bedeutet, dass der Anteil der PCR-positiven Nagelproben 48% höher war, wenn mit der Dermatophyten-Kultivierung verglichen wird. 365 (94%) der 389 Kultur-positiven Materialien waren PCR-positiv, was für eine sehr gute Korrelation von Kultur und PCR spricht. Nur bei 24 (6%) der 389 Nagelproben war die Kultur positiv, die PCR jedoch negativ. Das Blancophor®-Präparat war bei 610 von 1.293 Nagelproben (47%) positiv. Ein hoher Prozentsatz von diesen 610 Blancophor®-positiven Proben, nämlich 446 (73%), waren sowohl PCR-, als auch Kultur-positiv. Schimmelpilze und Hefepilze sind Ursache von positiven Blancophor®-Präparaten, bei denen die PCR negativ ist.

*T. rubrum* war der häufigste Erreger einer Nagelmykose. Kultur- und/oder PCR-positiv für *T. rubrum* waren 459 der 1.293 Proben (35,5%), *T. interdigitale* fand sich in 118 Proben (9,1%). *E. floccosum* war in nur einer einzelnen Probe ausschließlich mittels PCR nachweisbar.

### Schlussfolgerung

Neue molekulare Methoden ergänzen die konventionelle mykologische Diagnostik der Onychomykose und erhöhen damit die diagnostische Empfindlichkeit wesentlich. Bei der Dermatophyten-PCR handelt es sich um eine hochspezifische Nukleinsäure-Amplifikationstechnik zum direkten Nachweis der Erreger aus Nagelmaterial.

### Schlüsselwörter

Dermatomykosen, Dermatophytosen, *Tinea pedis*, Onychomykose, Tricho-

phyton *rubrum*, Blancophor®-Präparat, mykologische Diagnostik, Polymerasekettenreaktion, PCR, Dermatophyten-DNA.

## Einführung

Die Labordiagnostik von Dermatomykosen beruht traditionell auf dem Nativpräparat (KOH- oder Blancophor®-Präparat) und der Pilzkultur. Auch der histologische Nachweis von Pilzelementen hat, das soll an dieser Stelle unbedingt erwähnt werden, vor allem bei der Onychomykose eine sehr hohe Empfindlichkeit (10). Diverse molekularbiologische Methoden zum Direktnachweis von Pilz-DNA sind in den letzten zwei bis drei Jahren etabliert worden. In einer Vielzahl von Pilotstudien sind diese neuen molekularen Methoden zum Nachweis von Dermatophyten direkt im klinischen Material – Hautschuppen und Nagelspäne – evaluiert worden.

Heute, im Jahr 2015, kann man diese offenbar sehr sensitiven und spezifischen molekularen Labormethoden in der Dermatomykologie kaum noch ignorieren.

Der Nachweis von Dermatophyten-DNA mit Amplifikationstechniken, die in der Regel PCR (»polymerase chain reaction«/Polymerasekettenreaktion)-basiert sind, scheint eine höhere Sensitivität als die Methoden der konventionellen Pilzdiagnostik aufzuweisen. Der Erregernachweis ist ohne vorherige Kultivierung des Dermatophyten möglich. Ein weiterer wesentlicher Vorteil der Amplifikationstechniken stellt die Geschwindigkeit bis zum Vorliegen des Ergebnisses dar. Normal ist die »24-Stunden-Diagnostik« von Dermatophyten. Mittels Realtime-PCR liegen die Ergebnisse sogar bereits nach zwei bis vier Stunden vor (14).

In der vorliegenden, prospektiv durchgeführten Studie sollte eine große Anzahl von Nagelproben, die im Rahmen der Routinediagnostik in das dermatomikrobiologische Labor eingeschendet

wurden, mit einem PCR-EIA (Enzymimmunoassay) zum Nachweis von Dermatophyten-DNA untersucht werden. Der Wert des molekularbiologischen Direktnachweises von Dermatophyten-DNA im Vergleich zur konventionellen Diagnostik sollte bestimmt werden.

## Patienten und Methoden

### Patienten und Untersuchungsmaterialien

Insgesamt 1.293 Nagelproben, die über vier Monate, Februar bis Mai 2011, konsekutiv in das Labor Mölbis eingesandt wurden, sind vergleichend mittels Blancophor®-Präparat, kulturellem Pilznachweis und PCR-EIA zum Nachweis von Dermatophyten-DNA untersucht worden. Einsender waren zu über 90% niedergelassene Hautärzte und Hautärztinnen aus dem Leipziger und sächsischen Raum. Die hauptsächliche Verdachtsdiagnose war eine Onychomykose. Erfahrungsgemäß muss jedoch davon ausgegangen werden, dass zu mindestens 50% auch andere Nagelerkrankungen vorlagen und die mykologische Diagnostik lediglich zum Ausschluss einer Onychomykose erfolgte. Der überwiegende Anteil der Patienten war > 50 Jahre alt.

### Konventionelle mykologische Labordiagnostik

Die Nagelspäne wurden mit dem Blancophor®-Präparat sowie kulturell untersucht.

### Blancophor®-Präparat

Auf einen Objektträger wird mit einer Pasteur-Pipette ein Tropfen Blancophor®-Lösung (Bezug über DmykG/Deutschsprachige mykologische Gesellschaft) getropft. Blancophor® wird in 20%-iger wässriger Kaliumhydroxid (KOH)-Lösung, analog zur bekannten Kalilauge, hergestellt. In diese Gebrauchslösung wird das Nagelmaterial (Nagelspäne) mittels Platin-Impföse eingerührt. Nach Auflegen eines Deck-

gläschens werden die Objektträger über Nacht in der »feuchten Kammer« bei Raumtemperatur inkubiert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Mikroskopiert wurde mit dem 10er- und 40er-Objektiv.

#### Kultureller Pilznachweis

Für die kulturelle Anzucht von Dermatophyten, Spross- und Schimmelpilzen kamen Sabouraud-4%-Glukose-Agar sowie als Selektivmedium Mycosel®-Agar zur Anwendung. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C für mindestens drei Wochen.

#### Molekularbiologischer Nachweis von Dermatophyten-DNA mittels PCR-EIA

Alle Nagelmaterialien wurden zusätzlich zum konventionellen mykologischen Erregernachweis mittels eines Uniplex-PCR-EIA zum Direktnachweis von *T. rubrum*-, *T. interdigitale*- und *E. floccosum*-DNA untersucht (2). Der PCR-Elisa umfasst im Wesentlichen drei Schritte:

1. Extraktion der DNA aus Nagelmaterial mittels enzymatischem Verdau und Elution der DNA von einer Silikatmembran.
2. Amplifikation der spezifischen DNA unter Verwendung von Dermatophyten-spezifischen »Primern«.
3. Visualisierung des PCR-Produkts mittels Hybridisierung mit spezifischen Sonden und nachfolgendem Enzymimmunoassay (EIA) (28).

#### Isolierung der DNA aus Nagelmaterial

Die Extraktion der DNA aus Nagelmaterial erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Qiamp®-DNA-Mini-Kit. Nach dem enzymatischen Verdau der Zellmembranen mit Proteinase K wurde die freigewordene DNA während eines Zentrifugationsschritts an eine Silikatmembran einer Spinnsäule gebun-

den. Die gebundene DNA wurde daraufhin in drei Schritten von störenden Proteinen gereinigt und mit einem kleinen Volumenpuffer von der Spinnsäule eluiert. Mit diesem Verfahren wird sowohl menschliche DNA aus dem Nagelkeratin als auch Pilz-DNA gewonnen.

#### Amplifikation der Dermatophyten-DNA mittels PCR

Durch spezifische »Primer« erfolgte im »Mastercycler« mittels PCR die Vervielfältigung der Dermatophyten-DNA. Ein »Primer« des »Primer«-Paars war mit Digoxigenin am 5'-Ende markiert. Auf diese Weise ist auch das entstandene PCR-Produkt mit Digoxigenin markiert, wodurch die Detektion der DNA ermöglicht wird. Das Zielgen, welches von den »Primern« erfasst wird, entsprach dem Topoisomerase-II-Gen der Dermatophyten (13).

Verwendete »Primer« und Sonden entsprechend den in der Datenbank des »National Center for Biotechnology Information« (NCBI) in den USA ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)) hinterlegten Sequenzen:

#### *Trichophyton rubrum*

- AB096064.1 *Trichophyton rubrum* top2 Gen der DNA der Topoisomerase II
- >Primer\_TR-D-Dig CGGCTAGGAGGGCGTGGTAGAA
- >Primer\_TR-U
- GCCTGTTGTTCCGCTCATTCTT
- >Sonde\_TR-P-B CATATGATTACCTTCTGAGCGTAAG
- Fragmentlänge 907 Basen.

#### *Trichophyton interdigitale*

- AB096065.1 *Trichophyton interdigitale* top2 Gen der DNA der Topoisomerase II
- >Primer\_TI-D-Dig GGTGCCAGCATGTCTAGAC
- >Primer\_TI-U GCATGATTTAGAAAGTGAATGCTG
- >Sonde\_TI-P-B TCGAAGCCTTGGTAAAAGAAGG
- Fragmentlänge 390 Basen.

#### *Epidermophyton floccosum*

- AB096069.1 *Epidermophyton floccosum* top2 Gen der DNA der Topoisomerase II
- >Primer\_EF-D-Dig GATTCAGTTGTGACTAAGTGGACA
- >Primer\_EF-U
- CCGATCCATTCCCTCGGTGGTT
- >Sonde\_EF-P-B ACCTTTTGAGGTAAGTCCGTCT
- Fragmentlänge 1.330 Basen.

Der Mastermix enthielt 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5\*-Puffer mit 400 mM Tris-HCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 0,1% Tween-20, außerdem 200 µM je dNTP und die Taq-DNA-Polymerase. Der PCR-Ansatz wurde mit einem Endvolumen von 30 µl zusammengestellt. Das sind 6 µl Mastermix, 16,5 µl H<sub>2</sub>O, 0,75 µl »Primer«-U (20 µM nicht markierter »Primer«), 0,75 µl »Primer«-D-Dig (mit Digoxigenin markierter »Primer«) und 6 µl DNS als »Template«.

Als Negativkontrolle kamen 6 µl Wasser zum Einsatz, als Positivkontrolle 6 µl positive DNA. Die Tubes wurden mit Mineralöl überschichtet, um Verdunstungen und Kontaminationen zu vermeiden.

Das verwendete PCR-Programm beinhaltete die Initialdenaturierung bei 95 °C für 5 Minuten 30 Sekunden, es folgten 42 Zyklen: Denaturieren bei 95 °C für 15 Sekunden, »Annealing« bei 63 °C für 20 Sekunden, Extension bei 72 °C für 90 Sekunden und »Final-Extension« bei 72 °C für 7,7 Minuten.

#### Visualisierung des PCR-Produkts mittels PCR-EIA (DIG-Detektion)

Nach Amplifikation wurde das chemisch denaturierte PCR-Produkt mittels biotinylierter Sonde (Sequenz ebenfalls vom Topoisomerase-II-Gen) hybridisiert und an eine Streptavidinbeschichtete Festphase gebunden. Ungebundene, unspezifische Amplifikationsprodukte und DNA wurden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Nach Zugabe eines Peroxidasekonjugierten Anti-Digoxigenin-Anti-

körpers und Substrats (ABTS-Tabletten) zeigt die Farbentwicklung die positive Reaktion an. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgt bei einer Wellenlänge von 405 nm. Der Uni-plex-PCR-EIA erfasst separat *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *E. floccosum*.

## Ergebnisse

### Fluoreszenzmikroskopischer Pilznachweis in Nagelproben

Von den insgesamt in die Untersuchung eingeschlossenen 1.293 Nagelproben waren 610 mit Nachweis von Pilzmyzel sowie Pilzsporen mittels fluoreszenzmikroskopischem Blancophor®-Präparat positiv. Das entsprach einem Anteil von 47% positiven Nagelproben (Tab. 1).

### Kultureller Nachweis von Dermatophyten aus den Nagelproben

Von den insgesamt 1.293 Nagelmaterialien waren 389 (30%) positiv, das heißt es wuchsen Dermatophyten in der Pilzkultur (Tab. 1). Darunter waren die Dermatophyten-Spezies *T. rubrum* (n = 342) und *T. interdigitale* (n = 47). *E. floccosum* war kulturell nicht nachweisbar.

### Molekularbiologischer Nachweis von Dermatophyten-DNA mittels PCR-EIA

Dermatophyten-DNA war mittels PCR-EIA in 553 von 1.293 Proben (43%) nachweisbar. Da 30% der Proben kulturell-positiv waren, lag der Anteil der PCR-positiven Nagelproben 48% höher (Tab. 1 u. 2).

Im Umkehrschluss waren 365 (94%) der insgesamt 389 Kultur-positiven Materialien auch PCR-positiv (Tab. 2). Daraus lässt sich eine sehr gute Korrelation zwischen kulturellem Dermatophyten-Nachweis und der Dermatophyten-PCR ableiten. Nur bei 24 (6%) der 389 Kultur-positiven Nagelproben war trotz des kulturellen Dermatophyten-Nachweises die PCR negativ.

Tabelle 1		
Vergleich der mykologischen Diagnostik mittels Blancophor®-Präparat, kulturellem Nachweis der Erreger und PCR-EIA zum Nachweis von Dermatophyten-DNA aus Nagelmaterial. Untersucht wurden insgesamt 1.293 Nagelproben von Patienten mit Verdacht auf beziehungsweise zum Ausschluss einer Onychomykose		
	Nagelproben	Prozentsatz
Blancophor®-Präparat-positiv	610	47%
Kultur-positiv	389	30%
PCR-positiv	553	43%

Tabelle 2		
Vergleich zwischen kulturellem Dermatophyten-Nachweis und PCR-EIA zum Dermatophyten-DNA-Nachweis. Kultur-positiv Nagelproben n = 389 = 100%		
	Nagelproben	Prozentsatz
Kultur- und PCR-positiv	365	94%
Kultur-positiv und PCR-negativ	24	6%
Kultur-negativ und PCR-positiv	188	48%

Tabelle 3		
Verteilung der mit Kultur und/oder Dermatophyten-PCR-EIA in Nagelproben (n = 1.293) gefundenen Dermatophyten-Spezies		
	Nagelproben	Prozentsatz
Trichophyton rubrum	459	35,5%
Trichophyton interdigitale	118	9,1%
Epidermophyton floccosum	1	0,001%

### PCR und Blancophor®-Präparat

Das Blancophor®-Präparat war, wie oben ausgeführt, bei 610 von 1.293 Nagelproben (47%) positiv. Ein hoher Prozentsatz von diesen 610 im fluoreszenzoptischen Präparat positiven Proben, nämlich 446 (73%), war dabei sowohl PCR-, als auch Kultur-positiv. Schimmelpilze und Hefepilze sind

wahrscheinlich Ursache von positiven Blancophor®-Präparaten von Proben, die Dermatophyten-PCR negativ waren.

### Erregerspektrum der bei Onychomykose nachgewiesenen Dermatophyten

*T. rubrum* war der häufigste Erreger einer Nagelmykose (Tab. 3). Kultur-

und/oder PCR-positiv für *T. rubrum* waren 459 der 1.293 Proben (35,5%), *T. interdigitale* fand sich in 118 Proben (9,1%). *E. floccosum* war in nur einer einzelnen Probe ausschließlich mittels PCR nachweisbar, kulturell wuchs der Dermatophyt nicht (Abb. 1).

Mit Blick auf die einzelnen Dermatophyten-Spezies zeigt sich, dass für *T. rubrum* der überwiegende Teil der Proben (70%) sowohl Kultur- als auch PCR-positiv gewesen ist (Abb. 2). Nur bei 4% der Nagelproben war trotz negativer PCR *T. rubrum* kulturell nachweisbar. Im Umkehrschluss waren 26% der Proben Kultur-negativ, jedoch PCR-positiv für *T. rubrum*. Daraus ergibt sich die im Vergleich zur Kultur höhere Empfindlichkeit des molekularbiologischen Nachweises von *T. rubrum* mittels PCR-EIA.

Für *T. interdigitale* waren etwas weniger Nagelproben sowohl Kultur- als auch PCR-positiv (60%). Ebenfalls – genau wie bei *T. rubrum* – war nur bei 4% der Nagelproben trotz negativer PCR *T. interdigitale* kulturell nachweisbar. *T. interdigitale* war bei 36% der Nagelproben kulturell nicht nachweisbar, jedoch mittels PCR-EIA (Abb. 3).

## Besprechung

### Mikroskopischer Pilznachweis aus Nagelspänen mittels Blancophor®-Präparat

Die konventionellen Methoden Nativpräparat und kultureller Pilznachweis werden nach wie vor als »Goldstandard« der dermatomykologischen Diagnostik angesehen. Das Blancophor®-Präparat war in der vorliegenden Studie bei 610 von 1.293 Nagelproben (47%) positiv. Im Vergleich zur Kultur und PCR ist das Nativpräparat damit die empfindlichste Methode der mykologischen Diagnostik von Nagelspänen bei Verdacht auf eine beziehungsweise zum Ausschluss einer Onychomykose. Genau wie bei der histologischen Untersuchung von Nagelmaterial gilt auch für das Nativpräparat,

dass nicht auf den zugrunde liegenden Erreger geschlossen werden kann.

Ein hoher Prozentsatz von diesen 610 Blancophor®-positiven Proben, nämlich 446 (73%), waren sowohl PCR- als auch Kultur-positiv. Schimmelpilze und Hefepilze können Ursache von positiven Blancophor®-Präparaten, bei denen die PCR negativ ist, sein. In einer eigenen früheren retrospektiven Untersuchung von 5.077 Patienten mit Nagelerkrankungen fand sich jedoch lediglich in 34,4% ein positives KOH-Präparat (19). Es handelte sich dabei um ein einfaches Kalilaugen-Präparat, kein fluoreszenzoptisches wie in der vorliegenden Untersuchung. Der niedrige Anteil positiver KOH-Präparate erklärte sich aus der generell geringeren Empfindlichkeit dieses einfachen mikroskopischen Nativpräparats insbesondere bei Untersuchung von Nagelmaterial. Der Anteil von 47% positiven Blancophor®-Präparaten in der vorliegenden Studie liegt zwar deutlich höher als der Wert von 34,4% des KOH-Präparats in der früheren Studie, trotzdem kann vermutet werden, dass es bei beiden Methoden – KOH- und Blancophor®-Präparat – einen relevanten Anteil falsch-negativer Untersuchungsergebnisse gegeben hat.

Generell gilt, dass ein positives Nativpräparat keinen Rückschluss auf den zugrunde liegenden Erreger zulässt. Es kann sich dabei um Dermatophyten, jedoch auch um Hefe- und/oder Schimmelpilze handeln. Selbst Pilzsporen im Nativpräparat sind nicht pathognomonisch für Hefepilze. Pilzsporen, die zudem meist Arthrosporen entsprechen, können mikroskopisch durchaus auch bei einer Dermatophyten-Infektion beziehungsweise *Tinea unguium* gefunden werden.

### Kultureller Pilznachweis aus Nagelspänen

In der vorliegenden Studie waren Dermatophyten kulturell in 30% (389 von 1.293) der Nagelproben nachweisbar. Auch in der früheren Studie von Mügge et al. (19) fanden sich kulturell nur

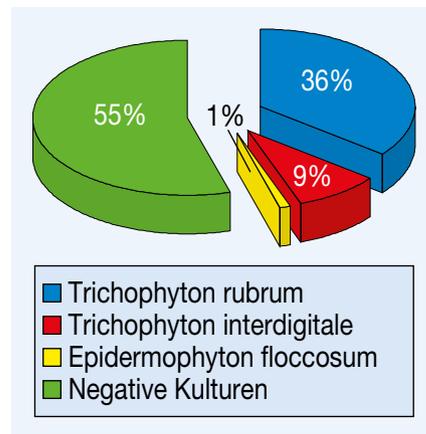


Abb. 1: Verteilung der Dermatophyten-Spezies, die mit kultureller Züchtung und/oder Dermatophyten-PCR-EIA aus Nagelspänen (n = 1.293 Proben) nachgewiesen wurden

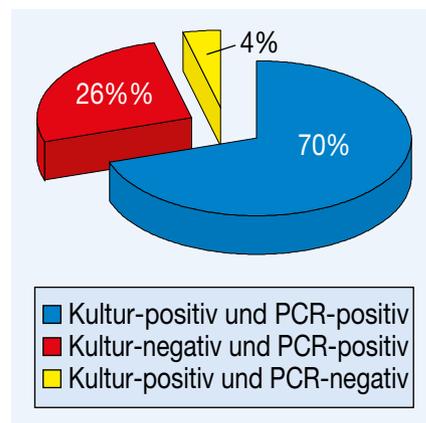


Abb. 2: *Trichophyton rubrum*. Nachweis des Dermatophyten in Nagelspänen (n = 459 Proben) mit kultureller Züchtung, Dermatophyten-PCR-EIA oder beiden Methoden

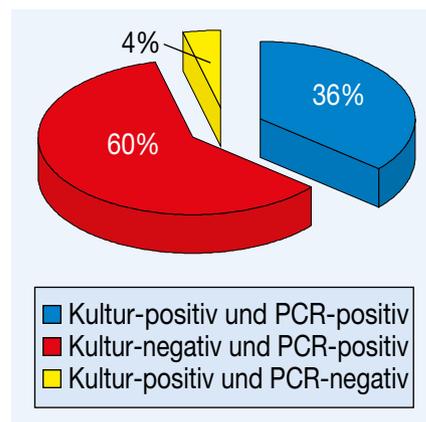


Abb. 3: *Trichophyton interdigitale*. Nachweis des Dermatophyten in Nagelspänen (n = 118 Proben) mit kultureller Züchtung, Dermatophyten-PCR-EIA oder beiden Methoden

bei 38,6% der Patienten Pilze als Erreger der Onychomykose. Das waren vor allem Dermatophyten, zu fast einem Drittel jedoch auch Hefepilze, der Anteil der Schimmelpilze betrug lediglich 1–2%. Der Dermatophyten-Anteil innerhalb der 38,6% nachgewiesenen Pilze in der Studie von Mügge et al. (19) betrug nur 68%, entsprechend zirka zwei Drittel aller gezüchteten Pilze, woraus sich ein noch niedrigerer Dermatophyten-Anteil insgesamt kalkulieren lässt.

Eine Ursache für die niedrige Nachweisrate der kulturellen Züchtung der Dermatophyten ist darin zu sehen, dass hier und auch in der früheren Studie von Mügge et al. nicht nur Patienten mit dem klinischen Verdacht auf eine Onychomykose einbezogen worden sind, sondern auch Patienten mit Nagelveränderungen anderer Genese. Erfahrungsgemäß werden schätzungsweise nur 50% der Nagelveränderungen, die klinisch wie eine Onychomykose imponieren, auch tatsächlich durch Pilze verursacht. Deshalb liegt der Wert des kulturellen Nachweises von Pilzen aus Nagelmaterial von 38,6% beziehungsweise 30% durchaus im plausiblen Bereich.

Wahrscheinlich liegt jedoch auch hier, genau wie bei den Nativpräparaten, ein beträchtlicher Anteil falsch-negativer Ergebnisse vor. Es kann nur spekuliert werden, dass es einen signifikanten Anteil von Proben gegeben hat, aus denen kulturell keine Pilze gezüchtet werden konnten, obwohl vermutlich eine Onychomykose vorlag. Die Ursache dafür kann in einer zuvor durchgeführten lokalen oder systemischen antimykotischen Behandlung liegen. Die fungizide oder fungistatische Wirkung der Antimykotika hemmt das Wachstum der Erreger in der Pilzkultur. Das ist auch eine Erfahrung aus der täglichen hautärztlichen Praxis. Viele Patienten, die sich mit Verdacht auf Nagelpilz vorstellen, wurden bereits vorab antimykotisch topisch behandelt, nicht selten wurde über einen Zeitraum von mehreren Monaten antimykotischer Nagellack aufgetragen.

### *Molekularbiologischer Pilznachweis in der Dermatomykologie*

Neue molekulare Methoden sollen die »diagnostische Lücke«, welche Präparat und Kultur lassen, schließen und die Empfindlichkeit sowie Spezifität der mykologischen Diagnostik erhöhen. Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAAT) nutzen »Primer« – Nukleinsäuresequenzen, die gezielt Genabschnitte der einzelnen Dermatophyten-Arten erkennen – zum spezifischen Erregernachweis im klinischen Material *in vitro* (9).

Als spezifische »Primer«-Sequenzen werden unter anderem die Sequenzen der Gene der Chitinsynthase (CHS1) sowie der Mikrosatelliten-Region ([GACA][4] oder [GTG][5]) verwendet (6, 21, 25). Die meisten Erfahrungen gibt es mit »Primern«, die gegen die Gensequenz der »Internal Transcribed Spacer-1« (ITS1)-Region der fungalen ribosomalen DNA (rDNA) gerichtet sind. Neben der ITS-1-Region hat sich auch eine Kombination aus ITS1-Region und 5.8S-ITS2-Region als sehr spezifisch für den Nachweis von Dermatophyten erwiesen (23). Verrier et al. (27) nutzten die Sequenz eines 28S ribosomalen DNA-Subunit-Amplicons für die noch empfindlichere »nested« PCR. Mit dieser »nested« PCR – dabei wird die PCR mit einem Extra-»Primer«-Paar wiederholt, um kleinste DNA-Mengen amplifizieren zu können – ließen sich aus Haut- und Haarproben bei Verdacht auf Tinea capitis deutlich mehr Dermatophyten nachweisen, als mittels herkömmlicher kultureller Verfahren.

### *Uniplex-PCR-EIA zum Direktnachweis von Dermatophyten-DNA aus klinischen Proben*

Hier kam zum Direktnachweis der Dermatophyten aus dem Nagelmaterial ein von Beifuss et al. (2) entwickeltes PCR-EIA-Verfahren als adaptierter und weiterentwickelter »In-House-Assay« zum Einsatz (28). Die dabei für das »Primer«-Paar verwendete spezifische Sequenz war eine Region des Topoisomerase-II-Gens der Dermatophy-

ten. Der Uniplex-PCR-EIA-Test erfasst separat *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *E. floccosum*.

Erwähnt werden soll an dieser Stelle jedoch auch, dass prinzipiell weitere Erreger nachgewiesen werden können, unter anderem *M. canis*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum*, *T. violaceum* und *T. Spezies* von *Arthroderma benhamiae*. Alle aufgeführten Dermatophyten werden heute in der dermatomykologischen Routinediagnostik gezielt mittels PCR-EIA nachgewiesen.

In der vorliegenden Studie war Dermatophyten-DNA mittels PCR-EIA in 553 von 1.293 Proben (43%) nachweisbar. Das bedeutet, dass der Anteil der PCR-positiven Nagelproben 48% höher war, wenn mit der Dermatophyten-Kultivierung verglichen wird. 365 (94%) der 389 Kultur-positiven Materialien waren PCR-positiv, was für eine sehr gute Korrelation von Kultur und PCR spricht. Nur bei 24 (6%) der 389 Nagelproben war die Kultur positiv, die PCR jedoch negativ. Der Grund dafür kann beispielsweise die nicht homogene Verteilung von Pilzelementen im klinischen Material sein.

Eine eigene Pilotstudie mit 218 Patienten unter dem Verdacht beziehungsweise zum Ausschluss einer Tinea pedis und Tinea unguium wurde zur Validierung des hier verwendeten PCR-EIA zum Dermatophyten-Nachweis durchgeführt und ist bereits publiziert (28). Kulturell waren bei 23,9% der 218 Patienten Dermatophyten nachweisbar (*T. rubrum* oder *T. interdigitale*). Mit dem PCR-EIA war dagegen bei 29,9% der Patienten Dermatophyten-DNA von entweder *T. rubrum* oder *T. interdigitale* nachweisbar. *E. floccosum* wurde in der Pilotstudie weder kulturell, noch mit PCR gefunden. Die PCR-EIA-Technik zum Nachweis von Dermatophyten-DNA wies im Vergleich zur Kultur eine höhere diagnostische Empfindlichkeit (79,0%) und diagnostische Spezifität (85,5%) auf.

Ein Vergleich der Ergebnisse des PCR-EIA mit »Primern« gegen das Topoisom-

merase-II-Gen aus der Studie von Winter et al. (28) mit einem Mikrosatelliten-PCR-EIA zum separaten Nachweis von *T. rubrum*-DNA wies für den letzteren Test die höchste Anzahl positiver Proben (69%) auf, schlechter war hierbei sogar das Nativpräparat (Blanco-phor®) mit 56% Positivrate (20). Der PCR-EIA (Topoisomerase II) hatte dagegen lediglich eine Positivrate von 44%. Damit war der PCR-EIA dem Mikrosatelliten-PCR-Test unterlegen.

Weitere vergleichende Untersuchungen zwischen den verschiedenen molekularbiologischen Methoden, die verschiedene Zielregionen der Dermatophyten-Gene nutzen und auf verschiedenen NAAT-Techniken beruhen, sollten erfolgen, um die PCR-Techniken hinsichtlich ihrer diagnostischen Effektivität einschätzen zu können.

Luk et al. (16) aus Hongkong setzten ebenfalls eine Uniplex-PCR mit »Primern«, die eine Dermatophyten-spezifische Sequenz des Topoisomerase-II-Gens erkennen, ein. Die PCR wurde mit dem KOH-Präparat und dem kulturellen Nachweis aus Nagelproben von 120 Patienten mit Verdacht auf Onychomykose verglichen. Das Nativpräparat war bei 35 Patienten (29,2%) positiv, die Kultur bei 12 Patienten (10%) und die PCR erbrachte 48 positive Proben (40%). Zwei Kultur-positive Proben wurden mit der PCR nicht erkannt. Im Umkehrschluss gelang es jedoch mittels PCR in 38 Kultur-negativen Nagelproben den Dermatophyten mittels PCR nachzuweisen.

Eine Studie aus Polen wies bei Proben (sowohl Dermatophyten-Kultur-Isolate als auch Hautschuppen und Haarwurzeln) von Tieren und von Menschen sogar eine 100%-ige Empfindlichkeit und Spezifität für die PCR zum Nachweis von *Microsporum canis*-DNA nach (4).

Mit einem PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Test unter Verwendung eines Pan-Dermatophyten-»Primers«, der die ITS-Region und zusätzlich die 18S-rDNA-Re-

gion erfasst, wurden in einer Studie in Indien 66 Haut- und drei Nagelproben untersucht (7). Dermatophyten fanden sich mikroskopisch, kulturell und mittels PCR bei 36 (54,54%), 42 (63,63%) und 47 (71,21%) der Proben. Unter den drei Nagelproben war lediglich eine positiv für Dermatophyten, sowohl mikroskopisch als auch kulturell und mit PCR.

Sánchez et al. (24) fanden bei 78,2% von 225 untersuchten Nagelproben eine Konkordanz der herkömmlichen kulturellen Nachweismethode der Dermatophyten und der »nested« PCR zum Dermatophyten-DNA-Nachweis.

Die Empfindlichkeit ließ sich noch steigern, wenn beide Methoden – konventioneller Pilznachweis und molekularbiologischer Direktnachweis der Pilz-DNA – gleichzeitig erfolgten. Das Ergebnis der mykologischen Untersuchung mittels PCR liegt innerhalb von 24 Stunden vor. Nur die PCR-negativen Proben müssen weiter bebrütet werden. Ein Grund dafür ist, dass falsch-negative PCR-Ergebnisse, wenngleich selten, möglich sind, und deshalb noch ein Dermatophyt in der Pilzkultur wachsen könnte. Außerdem können Nicht-Dermatophyten-Schimmelpilze (»non dermatophyte moulds« oder NDM) und Hefepilze potenzielle Ursache der Onychomykose sein. Der Nachweis dieser Pilze erfolgt ausschließlich kulturell.

#### *Hybridisierung von immobilisierten Oligonukleotid-Sonden und PCR-Produkten zum Direktnachweis von Dermatophyten und Candida albicans*

Ein in Taiwan entwickelter Oligonukleotid-Array-Test basierte auf der Hybridisierung (Digoxigenin-markierte Amplicons) von an einer Nylonmembran immobilisierten Spezies-spezifischen Oligonukleotid-Sonden (ITS-Region der rRNA) mit durch universelle »Primer« amplifizierten PCR-Produkten. Der Oligonukleotid-Array-Test wurde zum Direktnachweis von Dermatophyten und *Candida albicans* in Hautproben eingesetzt (11).

Insgesamt 32 Proben von 29 Patienten wurden vergleichend mit Kultur und dem Oligonukleotid-Array-Test untersucht. Der Oligonukleotid-Array-Test hatte im Vergleich zur Kultur eine signifikant höhere Empfindlichkeit (100% vs. 52,6%) und einen besseren negativen Vorhersagewert (100% vs. 59,1%). Bei der Spezifität fand sich zwischen PCR und dem Oligonukleotid-Array-Test kein signifikanter Unterschied.

#### *Multiplex-PCR zum Pilznachweis in der Dermatomykologie*

Mit einem kommerziell erhältlichen PCR-Kit zum Nachweis von *T. rubrum*-DNA (ITS-Region) und Pan-Dermatophyten-DNA (Chitinsynthase-1-Gen) wurden in einer Studie in Singapur 107 Nagelproben untersucht (5). Kulturell waren 57 (53%) Proben positiv (38 Dermatophyten und 19 Nicht-Dermatophyten-Pilze). Dagegen waren 77 (72%) Nagelproben PCR-positiv (63 *T. rubrum* und 14 Pan-Dermatophyten). Insgesamt 37 Proben (35%) waren mit beiden Methoden – Kultur und PCR – positiv. Die PCR war, da bei 39 Kultur-negativen Nagelproben mit PCR ein Dermatophyt nachgewiesen werden konnte, um 37% empfindlicher als die Kultur.

Ebenfalls mit diesem kommerziell verfügbaren Multiplex-PCR-Kit wurde in Schweden eine Untersuchung durchgeführt (15). PCR-positiv waren 37% der 191 Haut- und Haarproben. Kulturell fanden sich Dermatophyten dagegen in 31% der Proben, mikroskopisch waren 39% der Präparate positiv. Diagnostische Empfindlichkeit, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert betragen für die PCR 83%, 84%, 71% beziehungsweise 91%. Bei Hautproben erwies sich die PCR mit 88% empfindlicher als in Haarproben (58%).

*Spiliopoulou et al.* (26) nutzten die gerade erwähnte Multiplex-PCR (»Dermatophyte PCR kit«) zum Nachweis von Dermatophyten-DNA aus 418 Nagelproben. Der Testkit nutzt zwei »Primer«-Paare. Das erste (panDerm1 59-GAAGAAGATTGTCGTTT-

GCATCGTCTC-39 and panDerm2 59-CTCGAGGTCAAAAAGCACGCCA-GAG-39) richtet sich gegen das Chitinsynthase-kodierende Gen (Chitinsynthase 1 [chs1]) und weist Dermatophyten ganz allgemein nach. Das zweite »Primer«-Paar (Trubrum-for 59-TCTTTGAACGCACATTGCGCC-39 und Trubrum-rev 59-CGGTCCTGAGG-GCGCTGAA-39) richtet sich gegen das Gen der ITS-2-Region und weist spezifisch *T. rubrum* nach. Mit der Multiplex-PCR fanden sich 126 (30,1%) Dermatophyten-positive Proben, dagegen erbrachte die Kultur nur bei 44 (10,5%) der Proben einen positiven Befund mit Nachweis des Dermatophyten. Im Nativpräparat waren 63 (15,%) der Proben positiv. *T. rubrum* ließ sich in 116 der 126 (92%) PCR-positiven Nagelproben nachweisen, außerdem in 40 von 44 (91%) Dermatophyten-positiven Kulturen. Durch die PCR erhöhte sich der Spezies-spezifische Nachweis von Dermatophyten um 21,1%, die Rate der PCR-positiven Proben war damit im Vergleich zur Kultur dreimal höher.

#### *Multiplex-PCR zum Nachweis von Dermatophyten, Hefe- und Schimmelpilzen*

Ein anderer kommerziell verfügbarer Multiplex-PCR-Test, der in Dresden entwickelt worden ist, ermöglicht die simultane Amplifikation von 23 Dermatomykose-Erregern (Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilzen), deren DNA mittels Agarosegelelektrophorese detektiert wird (17). Die Identifizierung erfolgt für einige der Erreger bis zur Spezies-Ebene (z.B. *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *Scopulariopsis brevicaulis*). Andere Erreger werden jedoch nur bis zur Gattungsebene identifiziert (z.B. *Candida* spp., *Aspergillus* spp., einige Trichophyton-Arten). In einer Evaluierungsstudie wurden 253 klinische Proben vergleichend mittels Mikroskopie, Kultur und Multiplex-PCR untersucht (17).

Diagnostische Empfindlichkeit, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert der PCR betragen 87,3%, 94,3%,

87,3% und 94,3%, immer bezogen auf Dermatophyten, die auch mikroskopisch und/oder kulturell nachgewiesen wurden. Die entsprechenden Werte für *Candida* spp. betragen 62,7%, 93,5%, 77,8%, und 87,4%. Mit der PCR ließen sich im Vergleich zur Kultur zusätzlich in 38 Materialien *T. rubrum* und 12 mal *T. interdigitale* nachweisen.

#### *»Realtime«-PCR zum Dermatophyten-DNA-Nachweis*

Die »Realtime«-PCR (»Echtzeit«-Polymerasekettenreaktion) zum direkten Nachweis von Dermatophyten aus klinischem Material ist zwar apparativ aufwendig (»LightCycler«), wenn jedoch einmal etabliert, stellt sie eine vergleichsweise schnell durchführbare, hochspezifische und empfindliche molekulare Methode der Amplifizierung und gleichzeitigen Quantifizierung der DNA dar. Auch mit »Realtime«-PCR können mehrere Erreger nachgewiesen werden, jedoch nicht gleichzeitig, sondern konsekutiv. Eine Untersuchung aus Frankreich zeigte, dass trotzdem auch kritisch mit den Ergebnissen der »Realtime«-PCR umgegangen werden muss (22). Falsch-negative Ergebnisse sind möglich, vor allem infolge einer inhomogenen Verteilung der Dermatophyten-DNA im Haut- oder Nagelmaterial.

Eine schwedische Untersuchung verglich an 202 klinischen Hautproben die konventionelle kulturelle Diagnostik mit einer neuen »Realtime«-PCR-Methode. Bei 103 (51%) der Proben war Pilz-DNA nachweisbar, dagegen eine positive Pilzkultur nur bei 79 (39%). Mit der »Realtime«-PCR ließ sich bei 94 der 103 PCR-positiven Proben (91%) *T. rubrum* identifizieren, bei acht (entsprechend 8%) *T. interdigitale* (3). Hier wird nochmals bestätigt, dass die PCR, genau wie in der vorliegenden Studie, einen höheren Anteil von positiven Ergebnissen erbringt, wenn man sie mit der Pilzkultur vergleicht. Die »Realtime«-PCR scheint dabei noch etwas empfindlicher zu sein, als die Uniplex-PCR.

Auch Miyajima et al. (18) setzten eine »Realtime«-PCR ein und verwendeten »Primer«, die gegen die ITS1-Region der rDNA von *T. rubrum* und *T. mentagrophytes* gerichtet waren. Der verursachende Dermatophyt ließ sich in allen 42 Proben von 32 Patienten mit *Tinea pedis* und *Tinea unguium* mit hoher Empfindlichkeit und Spezifität nachweisen. Die »Realtime«-PCR ist eine bemerkenswert schnell durchführbare Methode, hier lagen die Ergebnisse bis zur Spezies-Bestimmung aus klinischen Proben innerhalb von drei Stunden vor. Aktuell wurde aus Polen berichtet, dass der Direktnachweis von *T. rubrum* mittels »Realtime«-PCR mit DNA-Extraktion und nachfolgender Detektion der Spezies-spezifischen DNA nur zwei Stunden dauert (14).

Eine Studie aus Frankreich nutzte ebenfalls die »Realtime«-PCR zum Direktnachweis von Dermatophyten in 112 Proben, davon 54 Nagel- und 58 Hautproben von insgesamt 52 Patienten mit dem Verdacht auf eine Dermatophytose (22). Es wurde eine Probenbasierte diagnostische Empfindlichkeit von 79% erreicht, die Spezifität betrug 73%. Dagegen lag die Patienten-basierte diagnostische Empfindlichkeit bei 100%, die Spezifität bei 82%. Die PCR führte zu signifikant weniger falsch-negativen Ergebnissen in Hautproben. Die Nachweisrate in Nagelmaterial war ebenfalls signifikant besser, wenn mit Hautproben verglichen wurde (diagnostische Odds-Ratio = 24,0 vs. 5,5).

#### *Höhere Spezifität molekularer Methoden bei der Spezies-Identifizierung von Dermatophyten*

Zunehmend werden molekularbiologische Methoden als Kulturbestätigungstest zur Identifizierung von kulturell isolierten Dermatophyten eingesetzt. In der Regel werden dafür Sequenzierungstechniken genutzt. Die gefundenen Sequenzen der Pilzisolat werden mit in Datenbanken hinterlegten Referenzsequenzen verglichen, und so kann auf die Spezies geschlossen wer-

den. Neben der NCBI-Datenbank wird zunehmend auch die Datenbank des »Centraalbureau voor Schimmelcultures« (CBS) des »Fungal Biodiversity Centre« in Utrecht, Niederlande, genutzt. Eine Studie aus Indien zum Beispiel nutzte zur Untersuchung der genotypischen Variabilität der Dermatophyten einen PCR-Fingerprint-Test mit einem repetitiven Oligonucleotid (GACA)<sub>4</sub>-»Primer« zur Identifizierung der Spezies sowie der Stammvariationen von Dermatophyten (8).

Eine neue Zielstruktur zur Spezies-Identifizierung von Dermatophyten stellt die Genregion, welche die Metalloproteinase-1 kodiert, dar (12). Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse und eine PCR mit »Primern«, die gegen das Metalloproteinase-1-Gen gerichtet sind, wurden gerade erfolgreich eingesetzt, um *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *M. canis* und *M. gypseum* zu differenzieren. Nach Restriktionsenzymverdau wurden die Proben enzymatisch aufgetrennt. Insgesamt vier verschiedene Muster von DNA-Fragmenten ließen sich innerhalb der sechs Pilzarten diskriminieren.

Eine andere Studie aus dem Iran verglich die morphologische Differenzierung mit der molekularbiologischen Identifizierung (PCR-RFLP nach Amplifizierung der ITS1-5.8S-ITS2-rDNA-Region) von Dermatophyten-Isolaten. Es fand sich eine sehr schlechte richtige Identifizierungsrate für die konventionellen morphologischen Methoden (1). Morphologisch waren unter den in der Routinediagnostik gefundenen Pilzen 18 Isolate (6,8%) *T. rubrum* und 136 Isolate (52,10%) *T. interdigitale*. Mit PCR-RFLP war *T. rubrum* dagegen mit 94 Stämmen (36,01%) häufigster Dermatophyt. *T.-interdigitale*-Stämme fanden sich insgesamt 71 (27,2%). Von den 94 mit PCR-RFLP als *T. rubrum* identifizierten Isolaten war ein hoher Prozentsatz (80,8%) morphologisch anders differenziert worden, vorzugsweise als *T. interdigitale* (75,5%),

jedoch auch als *E. floccosum*, *M. canis*, *T. verrucosum* und *T. tonsurans*. Acht Stämme von *T. interdigitale* und zwei *E.-floccosum*-Stämme waren morphologisch als »unbekannte Spezies« differenziert worden.

Diese Ergebnisse sind einerseits erstaunlich und kaum plausibel zu erklären, da in der Regel davon ausgegangen wird, dass die herkömmliche Pilzdifferenzierung einfach und richtig durchführbar sein sollte. Andererseits muss kritisch vermerkt werden, dass auch in der Routinediagnostik hierzulande, egal ob in Praxis oder im Laborinstitut, in einem beträchtlichen Prozentsatz keine adäquate Speziesdifferenzierung erfolgt und damit auch kein richtiges Ergebnis der Pilzbestimmung vorliegt. erinnert sei beispielsweise an die Urease-Reaktion zur Unterscheidung von *T. rubrum* und *T. interdigitale*, die heute kaum noch durchgeführt wird, nicht zuletzt auch wegen des neuerdings nicht mehr kommerziell verfügbaren Harnstoff-Nährmediums nach *Christensen*.

Einmal mehr unterstreicht diese vergleichende morphologische und molekularbiologische Studie aus dem Iran, dass der Wert der neuen molekularen Amplifikationstechniken auch darin zu sehen ist, dass mit diesen modernen Methoden eine akkurate und hochspezifische mikrobiologische Diagnostik mit hoher Richtigkeit der Differenzierungsergebnisse erfolgen kann. Die bislang noch vorhandene Expertise in der Dermatomykologie geht zumindest in Deutschland mehr und mehr verloren. Grund dafür ist, dass mykologisch ausgebildete Hautärztinnen und Hautärzte heute weitgehend fehlen.

### Abrechnung molekularbiologischer Verfahren der dermatomykologischen Diagnostik

Der molekularbiologische Nachweis von Dermatophyten-DNA mit der Uniplex- oder »Realtime«-PCR und auch der Nachweis von anderen Pilzen

(Hefe- und Schimmelpilz-DNA) mit Multiplex-PCR aus Hautschuppen, Haaren und Haarwurzeln sowie Nagelmaterial ist momentan nur über die GOÄ als privatärztliche Laborleistung abgebildet und so abrechenbar. Für gesetzlich krankenversicherte Patienten gab es bislang den Modus der Abrechnung über eine sogenannte Analognummer im EBM. Inwieweit das weiter so möglich sein wird, ist unklar. Deshalb muss unbedingt vor Einführung der genannten molekularbiologischen Methoden in die Routinediagnostik mit der jeweiligen Krankenversicherung (KV) gesprochen beziehungsweise die Berechtigung zur Abrechnung der PCR bei der zuständigen KV beantragt werden.

Um die neuen molekularbiologischen Methoden, die zu einem wesentlichen Zuwachs der diagnostischen Empfindlichkeit und Spezifität beim Nachweis von Erregern von Dermatomykosen und Onychomykosen führen, auch in der Routinediagnostik durchführen zu können, muss die Abrechnung auch über den EBM gewährleistet sein. Der Berufsverband der Deutschen Dermatologen (BVDD) und die Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG) sind hierbei gefordert, sich dafür einzusetzen, dass eine EBM-Kennziffer zum molekularbiologischen Dermatophyten-Nachweis in absehbarer Zeit in den EBM aufgenommen wird. Die alleinige privatärztliche Abrechnung der Dermatophyten- und Pilz-PCR vertieft die Kluft zwischen den Patienten, die in der Lage sind, die Kosten zu tragen, und dem Großteil derjenigen, die dazu eben nicht in der Lage ist. Mit Blick auf die hohe Punktprävalenz der Onychomykose von 12,4% in Deutschland, es handelt sich bei der Nagelpilzinfektion um eine echte »Volkskrankheit«, ist die »Zwei-Klassen-Medizin« bei der mykologischen Diagnostik nicht zu akzeptieren. Auch wegen der diversen Komplikationen und Folgeerkrankungen der Onychomykose sollte die hochempfindliche molekulare mykologische Diagnostik für die betroffenen Patienten unabhängig vom Krankenversicherungsstatus ermöglicht werden.

### Fazit

Der molekularbiologische Nachweis von Dermatophyten-DNA hat sich in der hier vorgelegten Studie im Vergleich zu den konventionellen mykologischen Labormethoden des mikroskopischen und kulturellen Pilznachweises als deutlich empfindlicher erwiesen. Eine Vielzahl von weiteren, in den letzten Jahren veröffentlichten Studien zum Einsatz der PCR in der Dermatomykologie kommt zum selben Ergebnis und bescheinigt den Nukleinsäure-Amplifikationstechniken eine höhere diagnostische Empfindlichkeit als dem Nativpräparat und der kulturellen Züchtung der Dermatophyten. Trotzdem ist das Fazit des überwiegenden Anteils der durchgeführten Studien zum Einsatz der PCR zum Direktnachweis von Pilzen bei Verdacht auf eine Dermato- und Onychomykose, dass vorerst nicht auf die konventionelle Diagnostik verzichtet werden soll. Die PCR kann und soll aktuell die traditionelle Diagnostik nicht ersetzen. Insbesondere das mikroskopische Präparat in Form des fluoreszenzoptischen Nachweises von Pilzen im Nagelmaterial ist sehr empfindlich, wobei die gefundenen Pilzelemente keinen Rückschluss auf die verursachende Pilzgattung oder Pilzspezies zulassen.

Der wesentliche Vorteil der Nukleinsäure-Amplifikationstechniken zum Dermatophyten- oder generellen Pilznachweis besteht nicht zuletzt auch darin, dass selbst nicht vitale Pilzelemente (Nukleinsäuren) im Nagelmaterial beispielsweise auch bei Patienten, bei denen vor Materialentnahme eine topische (Nagellack) oder systemische antimykotische Therapie erfolgte, nachgewiesen werden können. Wenn die PCR zusätzlich zur konventionellen Diagnostik eingesetzt wird, erhöht sich die Empfindlichkeit der mykologischen Diagnostik insgesamt signifikant. Die diagnostische Spezifität der mykologischen Diagnostik wird ebenfalls erhöht, nicht zuletzt verbessert sich die Richtigkeit der Erregeridentifizierung durch die DNA-basierten molekularen Methoden.

Ein Vorteil der Amplifikationstechniken zum Dermatophyten-Nachweis liegt zudem in der signifikanten Verkürzung der Zeit bis zur Diagnosestellung. Die Uniplex- und Multiplex-PCR, auch in der Form der »nested«-PCR, kann innerhalb von 24 oder 48 Stunden durchgeführt werden. Bei der »Real-time«-PCR liegt das Ergebnis des Direktnachweises des Erregers aus dem klinischen Material bis zur Spezies-spezifischen Identifizierung des Dermatophyten sogar noch schneller vor, im Idealfall innerhalb von zwei bis drei Stunden.

Die Methode ist wirtschaftlich, lediglich der Personalaufwand ist hoch. Der Einsatz von apparativer Technik, zum Beispiel Extraktions- und Pipettierautomaten, erlaubt die Rationalisierung der Laborarbeit. Mittelfristig wird die konventionelle dermatomykologische Diagnostik durch molekulare Techniken ergänzt werden. Denkbar sind zum Beispiel einfache Analysensysteme auf PCR-Basis, die in der Hautarztpraxis eine Dermatophyten-Sofort-Diagnostik erlauben.

#### Literatur

- Ahmadi B, Mirhendi H, Shidfar MR, Nouripour-Sisakht S, Jalalizand N, Geramisho M, Shokoohi GR (2015): A comparative study on morphological versus molecular identification of dermatophyte isolates. *J Mycol Med* 25, 29–35
- Beifuss B, Bezold G, Gottlob P, Borelli C, Wagener J, Schaller M, Kortling HC (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
- Bergman A, Heimer D, Kondori N, Enroth H (2013): Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 19, E205–E211
- Brillowska-Dabrowska A, Michalek E, Saunte DM, Nielsen SS, Arendrup MC (2013): PCR test for *Microsporum canis* identification. *Med Mycol* 51, 576–579
- Chandran NS, Pan JY, Pramono ZA, Tan HH, Seow CS (2013): Complementary role of a polymerase chain reaction test in the diagnosis of onychomycosis. *Australas J Dermatol* 54, 105–108
- Dhib I, Fathallah A, Charfeddine IB, Meksi SG, Said MB, Slama F, Zemni R (2012): Evaluation of Chitin synthase (CHS1) polymerase chain reaction assay in diagnosis of dermatophyte onychomycosis. *J Mycol Med* 22, 249–255
- Elavarashi E, Kindo AJ, Kalyani J (2013): Optimization of PCR-RFLP directly from the skin and nails in cases of dermatophytosis, targeting the ITS and the 18S ribosomal DNA regions. *J Clin Diagn Res* 7, 646–651
- Elavarashi E, Kindo AJ, Kalyani J, Sudha R (2014): Application of PCR fingerprinting using (GACA)<sub>4</sub> primer in the rapid discrimination of dermatophytes. *Indian J Med Microbiol* 32, 236–239
- Gräser Y, Czaika V, Ohst T (2012): Diagnostic PCR of dermatophytes – an overview. *J Dtsch Dermatol Ges* 10, 721–726
- Grover C, Chaturvedi UK, Reddy BS (2012): Role of nail biopsy as a diagnostic tool. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 78, 290–298
- Han H, Hsu M, Choi J, Hsu CK, Hsieh H, Li H, Chang H, Chang T (2014): Rapid detection of dermatophytes and *Candida albicans* in onychomycosis specimens by an oligonucleotide array. *BMC Infect Dis* 14 (1), 581 (ePub ahead of print)
- Jung HJ, Kim SY, Jung JW, Park HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ (2014): Identification of dermatophytes by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of metalloproteinase-I. *Ann Dermatol* 26, 338–342
- Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Kawasaki M, Fujihiro M, Kikuchi A (2003): Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. *J Dermatol Sci* 33, 41–54
- Kobylak N, Bykowska B, Nowicki R, Brillowska-Dabrowska A (2015): Real-time PCR approach in dermatophyte detection and *Trichophyton rubrum* identification. *Acta Biochim Pol* 62, 119–122
- Kondori N, Tehrani PA, Strombeck L, Faergemann J (2013): Comparison of dermatophyte PCR kit with conventional methods for detection of dermatophytes in skin specimens. *Mycopathologia* 176, 237–241
- Luk NM, Hui M, Cheng TS, Tang LS, Ho KM (2012): Evaluation of PCR for the diagnosis of dermatophytes in nail specimens from patients with suspected onychomycosis. *Clin Exp Dermatol* 37, 230–234
- Mehlig L, Garve C, Ritschel A, Zeiler A, Brabetz W, Weber C, Bauer A (2014): Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses* 57, 27–34
- Miyajima Y, Satoh K, Uchida T, Yamada T, Abe M, Watanabe S, Makimura M, Makimura K (2013): Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *J Dermatol Sci* 69, 229–235
- Mugge C, Hausteiner UF, Nenoff P (2006): Causative agents of onychomycosis – a retrospective study. *J Dtsch Dermatol Ges* 4, 218–228
- Pankewitz F, Nenoff P, Uhrlass S, Bezold G, Winter I, Gräser Y (2013): Development of a novel polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trichophyton rubrum* onychomycosis. *Br J Dermatol* 168, 1236–1242
- Pasquetti M, Peano A, Soglia D, Min AR, Pankewitz F, Ohst T, Gräser Y (2013): Development and validation of a microsatellite marker-based method for tracing infections by *Microsporum canis*. *J Dermatol Sci* 70, 123–129
- Paugam A, L'Ollivier C, Viguie C, Anaya L, Mary C, de PG, Ranque S (2013): Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. *J Microbiol Methods* 95, 218–222
- Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, Shidfar M, Zaini F, Eshraghian M, Jalalizand N, Nouripour-Sisakht S, Hosseinpour L, Mirhendi H (2012): Use of single-enzyme PCR-restriction digestion barcode targeting the internal transcribed spacers (ITS rDNA) to identify dermatophyte species. *Iran J Public Health* 41, 82–94
- Sanchez MJ, Pico AM, Tejedor FM, Sanchez MJ, Acevedo RM (2014): Using a polymerase chain reaction as a complementary test to improve the detection of dermatophyte fungus in nails. *J Am Podiatr Med Assoc* 104, 233–237
- Spesso MF, Nuncira CT, Burstein VL, Masih DT, Dib MD, Chiapello LS (2013): Microsatellite-primed PCR and random primer amplification polymorphic DNA for the identification and epidemiology of dermatophytes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32, 1009–1015
- Spiliopoulou A, Bartzavali C, Jelastopulu E, Anastassiou ED, Christofidou M (2015): Evaluation of a commercial PCR test for the diagnosis of dermatophyte nail infections. *J Med Microbiol* 64, 25–31
- Verrier J, Krahenbuhl L, Bontems O, Fratti M, Salamin K, Monod M (2013): Dermatophyte identification in skin and hair samples using a simple and reliable nested polymerase chain reaction assay. *Br J Dermatol* 168, 295–301
- Winter I, Uhrlass S, Krüger C, Herrmann J, Bezold G, Winter A, Barth S, Simon JC, Gräser Y, Nenoff P (2013): 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. *Hautarzt* 64, 283–289

#### Anschrift für die Verfasser:

Prof. Dr. med. Pietro Nenoff  
Haut- und Laborarzt/Allergologie,  
Andrologie, Tätigkeitsschwerpunkt:  
Tropen- und Reisedermatologie  
(DDA)  
Labor für medizinische Mikrobiologie  
Partnerschaft Prof. Dr. med. Pietro  
Nenoff & Dr. med. Constanze Krüger  
Straße des Friedens 8  
04579 Mölbis  
E-Mail nenoff@  
mykologie-experten.de

