

2/2019 April

C 14118

derm

Praktische Dermatologie



omnimed
www.omnimedonline.de

Nachweis und Identifizierung von pathogenen Dermatophyten mittels Multiplex-Real-Time-PCR

Franziska Wittig, Silke Uhrlaß,
Constanze Krüger, Pietro Nenoff

Summary

Objectives

Fungal infections of nails, skin and hair (tinea) caused by dermatophytes such as *Trichophyton (T.) spp.*, *Microsporum (M.) spp.* or *Epidermophyton (E.) spp.* are one of the most common human infections in the world. As the epidemiology varies between different dermatophyte species a specific diagnosis plays an important role to ensure a targeted therapy, assess the source of infection and thereby prevent transmission.

In order to evaluate the DermaGenius® 2.0 multiplex real-time PCR assay (PathoNostics, Maastricht, The Netherlands), real-time PCR results were compared to routine diagnostic methods including fungal culture detection, microscopy and a standard in-house PCR-ELISA. In addition, Sanger sequencing was used for identification of dermatophytes not recognized by the routine methods.

Material and methods

Skin specimens as well as clinically isolated fungal cultures were used for macroscopic, partly microscopic as well as molecular identification of 16 different dermatophyte species using an uniplex PCR-ELISA. Sequencing of both, the ITS region of the ribosomal DNA and the *TEF1α* gene was used to identify dermatophytes that could not be differentiated by routine diagnostic methods. Real-time PCR was performed with the DermaGenius® 2.0 Complete multiplex real-time PCR kit.

Results

In total, all (n = 49) routinely pre-identified dermatophytes could be detected with real-time PCR. Out of 49 samples, real-time PCR could identify 37 (~76 %) correctly by their specific melting peak temperature. Fourteen samples were detected, but not differentiated including *T. soudanense* (n = 1) which was identified as *T. rubrum*, *T. erinacei* (n = 2) as *T. benhamiae*, *T. equinum* (n = 1) as *T. tonsurans* and *M. ferrugineum* (n = 1) as *M. canis*. Although different ITS genotype variants of *T. mentagrophytes* (n = 4), *T. quinckeanum* (n = 2) and *T. schoenleinii* (n = 1) were detected by real-time PCR, they all showed similar melting peak temperatures to either *T. interdigitale* or *T. mentagrophytes*.

Conclusion

The DermaGenius® 2.0 multiplex real-time PCR assay is able to identify the most frequently isolated and clinically prevalent dermatophytes and is suitable for routine diagnostic laboratories, but also dermatological clinics and offices, as it needs limited hands-on time.

However, the identification and differentiation of less common dermatophytes as well as different ITS genotype variants of *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* is still complicated since they are phylogenetically very closely related. After taking the anamnesis of patients and/or a fungal culture into consideration, only sequencing enables the identification of dermatophytes that could not be detected routinely.

Keywords

Dermatophytes, routine diagnostics, multiplex real-time PCR.

Zusammenfassung

Zielsetzung

Pilzinfektionen der Nägel, Haut und Haare (Tinea) gelten als die häufigste Form von Mykosen und werden durch Dermatophyten wie zum Beispiel *Trichophyton (T.) spp.*, *Microsporum (M.) spp.* und *Epidermophyton (E.) spp.* verursacht. Da sich die Epidemiologie der verschiedenen Dermatophyten-Arten unterscheidet, ist eine spezifische Diagnostik wichtig für eine gezielte und erfolgreiche Therapie, die Erkennung der Infektionsursache und die damit verbundene Vermeidung einer weiteren Übertragung.

Um die Anwendung der Real-Time-»Polymerase Chain Reaction« (PCR)-Methode für die routinemäßige Dermatophyten-Diagnostik zu beurteilen, wurden in dieser Studie die Ergebnisse des DermaGenius® 2.0 multiplex Real-Time-PCR-Assays (PathoNostics, Maastricht, Niederlande) mit routine-diagnostischen Methoden, einschließlich Dermatophyten-Kultivierung, Mikroskopie und einem Standard »In-house PCR-»Enzyme Linked Immunosorbent Assay«« (ELISA) verglichen. Zusätzlich wurde eine Sanger-Sequenzierung zur spezifischeren Identifizierung der Dermatophyten verwendet.

Material und Methoden

Klinisch isolierte Hautproben sowie Pilzkulturen wurden makroskopisch mittels Kultivierung, teils mikroskopisch sowie molekularbiologisch mithilfe eines Uniplex-PCR-ELISA analysiert und zur Identifizierung von 16 verschiedenen Dermatophyten-Arten verwendet. Zudem wurde die Methode der Sanger-Sequenzierung der »Internal Transcribed Spacer« (ITS)-Region

der ribosomalen DNA und des *TEF1 α* -Gens zur Identifizierung von Dermatophyten genutzt, die mithilfe routinediagnostischer Methoden nicht eindeutig erkannt werden konnten. Die Real-Time-PCR wurde mit dem Derma Genius® 2.0 Complete multiplex Real-Time-PCR-Kit durchgeführt.

Ergebnisse

Alle 49 routinemäßig identifizierten klinischen Proben und Kulturen wurden mithilfe der Real-Time-PCR detektiert. Davon konnten 37 (~76 %) anhand ihrer spezifischen Schmelzpeak-Temperaturen identifiziert werden. 14 Proben zeigten eine Schmelzkurve, konnten jedoch nicht unterschieden werden. Dazu zählten *T. soudanense* (n = 1), der als *T. rubrum* identifiziert wurde, *T. erinacei* (n = 2) als *T. benhamiae*, *T. equinum* (n = 1) als *T. tonsurans* und *M. ferrugineum* (n = 1) als *M. canis*. Obwohl verschiedene *T. mentagrophytes*-ITS-Genotyp-Varianten (n = 4), *T. quinckeanum* (n = 2) und *T. schoenleinii* (n = 1) in der Real-Time-PCR ebenfalls eine Schmelzkurve zeigten, ließen sich deren Schmelzpeak-Temperaturen nicht von *T. interdigitale* oder *T. mentagrophytes* unterscheiden.

Schlussfolgerung

Der DermaGenius® 2.0 multiplex Real-Time-PCR-Assay ist in der Lage, die am häufigsten isolierten, klinisch relevanten Dermatophyten zu identifizieren. Er ist geeignet für routinediagnostische Labore, aber auch Hautkliniken und dermatologische Praxen, da er robust ist und einen geringen Zeitaufwand benötigt.

Dennoch sind die Identifizierung und Differenzierung seltener Dermatophyten sowie verschiedener ITS-Genotyp-Varianten von *T. mentagrophytes* und *T. interdigitale* anspruchsvoll, da hier eine hohe phylogenetische Verwandtschaft vorliegt. Unter Berücksichtigung der Patientenanamnese und/oder der Kulturergebnisse können nur mithilfe der Sequenzierung Dermatophyten,

die routinemäßig nicht erkannt werden, eindeutig identifiziert werden.

Schlüsselwörter

Dermatophyten, Routinediagnostik, Multiplex-Real-Time-PCR.

Einleitung

Pilzinfektionen der Nägel, Haut und Haare – auch Dermatophytosen oder Tinea genannt – gelten als die häufigste und am weitesten verbreitete Form von Mykosen und werden durch Dermatophyten verursacht (1). Diese Gruppe der Fadenpilze besitzt die Fähigkeit, Hornzellen zu befallen und Keratin zu verstoffwechseln. *Trichophyton* (*T.*) *spp.*, *Microsporum* (*M.*) *spp.* und *Epidermophyton* (*E.*) *spp.* gelten als pathogene anthropophile oder zoophile Dermatophyten (2). Da sich die Epidemiologie verschiedener Dermatophyten-Arten unterscheidet, ist eine spezifische Diagnostik wichtig für eine gezielte und erfolgreiche Therapie, die Erkennung der Infektionsursache und die damit verbundene Vermeidung einer weiteren Übertragung.

Als Goldstandard der Dermatophyten-Diagnostik gilt die Kultivierung der Pilze auf speziellen Kulturmedien in Kombination mit der Mikroskopie. Die Grundlage dieser Methoden ist somit die makroskopische und mikroskopische Morphologie von Dermatophyten, die jedoch eine geringe Sensitivität und Spezifität aufweist. Weiterhin ist die Dermatophyten-Kultivierung mit zirka zwei bis vier Wochen Bebrütung sehr zeitaufwendig. Auch Proben, die mit Antimykotika vorbehandelt wurden, zeigen oftmals kein oder nur ein stark verlangsamtes Pilzwachstum (3).

Um die Dermatophyten-Diagnostik schneller und verlässlicher zu gestalten, kommen heutzutage zusätzlich molekularbiologische Methoden zum Einsatz (4). Dazu zählen beispielsweise die »Polymerase Chain Reaction« (PCR) (5) eine Uniplex-PCR-»Enzyme

Tabelle 1

Probenanzahl je Dermatophyten-Art	
Probenanzahl je	Dermatophyten-Art
3	<i>T. rubrum</i>
1	<i>T. soudanense</i>
5	<i>T. violaceum</i>
2	<i>T. interdigitale</i>
6	<i>T. mentagrophytes</i>
2	<i>T. quinckeanum</i>
5	<i>T. tonsurans</i>
1	<i>T. equinum</i>
1	<i>T. schoenleinii</i>
7	<i>T. benhamiae</i>
2	<i>T. erinacei</i>
5	<i>T. verrucosum</i>
6	<i>M. canis</i>
1	<i>M. ferrugineum</i>
1	<i>M. audouinii</i>
1	<i>E. floccosum</i>

Linked Immunosorbent Assay« (PCR-ELISA)-Methode (6), die Real-Time-PCR (7, 8), die PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (PCR-RFLP)-Methode (9) sowie die Sequenzierung (2, 10–12).

Um die Anwendung der Real-Time-PCR-Methode für die routinemäßige Dermatophyten-Diagnostik zu beurteilen, wurden in dieser Studie die Ergebnisse des DermaGenius® 2.0 multiplex Real-Time-PCR-Assays mit routinediagnostischen Methoden, einschließlich Dermatophyten-Kultivierung, Mi-

kroskopie und dem PCR-ELISA verglichen. Zusätzlich wurde die Methode der Sanger-Sequenzierung zur Identifizierung von Dermatophyten verwendet, die mithilfe routinediagnostischer Methoden nicht eindeutig erkannt werden konnten. Dabei wurde die »Internal Transcribed Spacer«(ITS)-Region der ribosomalen DNA (rDNA) und das Translations-Elongations-Faktor-1 α (*TEF1 α*)-Gen sequenziert.

Methoden

Probensammlung

In dieser Studie wurden insgesamt 49 Proben von 16 verschiedenen Dermatophyten-Arten verwendet (Tab. 1). Darunter waren 21 Hautschuppen von Patienten mit Verdacht auf Dermatophytose aus dem Raum Deutschland im Zeitraum von Juni bis November 2017. Es wurden Patienten aller Altersgruppen und beider Geschlechter in diese Studie einbezogen. Die klinischen Isolate wurden in Mycotrans-Specimen-Transport-Systemen (Mycotrans Ltd., Lanarkshire, Schottland, Vertrieb in Deutschland: Doenitz ProLab, Augsburg), verschlossenen Glas- oder Plastikschalen transportiert und im Labor für Medizinische Mikrobiologie in Mölbis routinediagnostisch angezüchtet und untersucht. Weiterhin kamen 28 Dermatophyten-Kulturen aus der Stammsammlung des Labors für medizinische Mikrobiologie zur Anwendung. Es handelte sich um klinische Isolate, die konventionell-morphologisch sowie mittels Sanger-Sequenzierung der DNA im Zeitraum von November 2015 bis Oktober 2017 identifiziert worden waren.

Dermatophyten-Kultivierung

Zur Anzüchtung von Dermatophyten aus klinischen Isolaten wurden die Proben in Schrägagarröhrchen sowohl auf Sabouraud-4 %-Glukose-Agar mit Chloramphenicol (SIFIN, Berlin, Deutschland), als auch auf Sabouraud-4 %-Glukose-Agar (Mycosel®) mit Chloramphenicol und Cycloheximid (Acti-

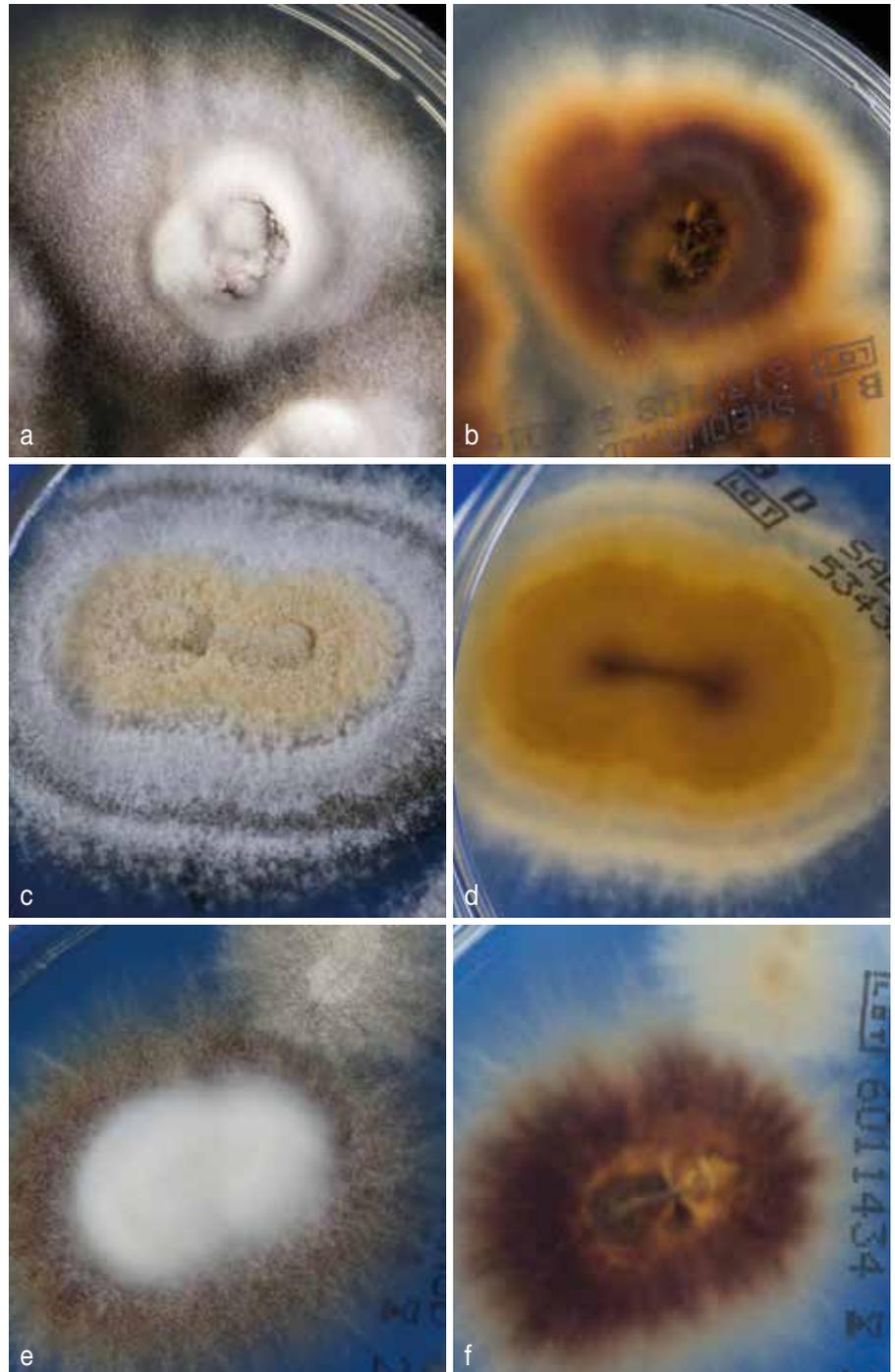


Abb. 1a–f1: Vorder- (links) und Rückseiten (rechts) von a) und b) *T. interdigitale*-, c) und d) *T. mentagrophytes*- sowie e) und f) *T. quinckeanum*-Kulturen. Dermatophytenkulturen auf Sabouraud-4 %-Glukose-Agar. Die Kolonie von *T. interdigitale* (ITS-Typ II) ist weiß und flauschig »behaart« mit einer rotbraunen Rückseite, die einen orange-gelblich-cremefarbenen Randbereich aufweist. Die Vorderseite der Kolonie von *T. mentagrophytes* (ITS-Typ III) ist puderig-gelblich in der Mitte mit weißem Rand. Es gibt jedoch auch flockig »behaarte« Varianten. Die Rückseite zeigt einen kleinen braunen Bereich in der Mitte und einen ockerfarben-gelblich-cremefarbenen Farbverlauf bis zum Rand. Die Rückseite von *T. mentagrophytes*-Kolonien kann jedoch auch blassbraun bis rotbraun, wie die hier gezeigte Rückseite von *T. interdigitale*, sein. Die Vorderseite der Kolonie von *T. quinckeanum* zeigt eine weiße flauschige Mitte mit braunem, ausgedehnt strahlig gewachsenem Randbereich. Die Rückseite ist rotbraun mit cremefarbenem Randbereich, wobei auch blassgelbe Varianten bekannt sind, ähnlich der hier gezeigten Rückseite der *T. mentagrophytes*-Kolonie

Tabelle 2

Seltene Dermatophyten-Arten mit den gleichen Schmelzpeak-Temperaturen wie DermaGenius® 2.0-Targets

DermaGenius® 2.0-Targets	Target mit gleicher Schmelzpeak-Temperatur
<i>T. tonsurans</i>	<i>T. equinum</i>
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. schoenleinii</i> <i>T. quinckeanum</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>T. soudanense</i>
<i>T. benhamiae</i>	<i>T. erinacei</i> <i>T. concentricum</i>
<i>M. canis</i>	<i>M. ferrugineum</i>

dion®) (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) aufgetragen und bei 28 °C inkubiert. Der semi-selektive Mycosel®-Agar verringerte das Wachstum von Pilzen, die nicht zur Gruppe der Dermatophyten gezählt werden.

Mikroskopie von Kulturen

Zur Kulturanalyse wurden Tesa-Abriss-Präparate von Dermatophyten-Kulturen mit Lactophenol-Baumwollblau (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig) gefärbt und zur Beurteilung mikroskopischer Charakteristika mit 10- und 40-facher Vergrößerung mikroskopiert.

DNA-Isolierung

Die DNA aller klinischen isolierten Hautproben sowie der Dermatophyten-Kulturen wurde gemäß eines modifizierten Herstellerprotokolls mithilfe des QIAamp-DNA-Mini-Kits im QIAcube-System (Qiagen, Venlo, Niederlande) isoliert. Dafür wurden Haut- und Pilzkulturproben in 180 µl ATL-Puffer mit 20 µl Proteinase K bei 56 °C über Nacht inkubiert. Die DNA von Nativproben wurde mit 60–70 µl und die von Kulturproben mit 200 µl AE-Puffer eluiert. Die Hautschuppen wurden bei 4 °C bis zur Analyse gelagert und Kulturproben aus der Stammsammlung bei –21 °C.

PCR-ELISA

Die DNA der Proben wurde mithilfe eines In-house-uniplex-PCR-ELISA analysiert (6). Spezifische Sonden detektierten dabei *T. rubrum*, *T. interdigitale/T. mentagrophytes*, *E. floccosum*, *M. canis* und *T. benhamiae*. Bei Verdacht wurde zusätzlich auf *T. violaceum*, *T. tonsurans* und *T. verrucosum* getestet. Die verwendeten Sonden können jedoch unter anderem *T. rubrum* und *T. soudanense*, *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* und *T. quinckeanum* sowie die drei Microsporum-Arten *M. canis*, *M. ferrugineum* und *M. audouinii* nicht unterscheiden.

Sequenzierung der ITS-Region der ribosomalen DNA und des TEF1α-Gens

Die Pilzkulturen von klinischen Isolaten wurden mithilfe der Sanger-Sequenzierung identifiziert. Die ITS-Region der ribosomalen DNA (rDNA), die aus teils 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2, und teils 28S rDNA besteht, und das Translations-Elongations-Faktor-1α (*TEF1α*)-Gen dienen als Identifikationsmarker (2, 10–12). Die PCR-Reaktionen enthielten Template-DNA und my-Budget 5x PCR-Mastermix (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland) mit

den entsprechenden Primern in einem 30-µl-Volumen angesetzt. Microsynth SeqLab (Göttingen, Deutschland) führte die Sequenzierung durch. Ein Vergleich der einzelnen Sequenzen mit den jeweiligen Referenz-Sequenzen erfolgte mittels »BLAST search« (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi) der GenBank des »National Center for Biotechnology Information« (NCBI; Bethesda, Maryland).

Real-Time-PCR-Assay

Bei der Real-Time-PCR werden spezifische Primer und fluoreszierende Sonden genutzt, um einen ausgewählten Teil der jeweiligen Pilz-DNA (Target-DNA) nachzuweisen. Während der Vervielfältigung der DNA werden die Erreger anhand ihrer entsprechenden Fluoreszenzsignale detektiert und auf Basis der Schmelzkurvenanalyse identifiziert. Die Schmelzpeak-Temperaturwerte sind jedoch keine Absolutwerte und können sich abhängig von der DNA-Isolierungsmethode sowie des verwendeten Real-Time-PCR-Instruments leicht unterscheiden.

In dieser Studie wurde die Real-Time-PCR entsprechend der Herstellerangaben mithilfe des gebrauchsfertigen DermaGenius® 2.0 Complete multiplex Real-Time-PCR-Kits mit Mix I und Mix II (PathoNostics, Maastricht, Niederlande) angesetzt und mit dem Real-Time-PCR-Instrument LightCycler 480 II (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde Mix I zur Detektion von *T.-rubrum*-, *T.-soudanense*- und *T.-violaceum*-DNA sowie von *T.-interdigitale*-, *T.-mentagrophytes*- und *T.-tonsurans*-DNA verwendet. Obwohl dieser Mix neben den Trichophyton-Arten auch *Candida albicans* nachweisen kann, wurde der Hefenachweis in dieser Studie vernachlässigt.

Zur Identifizierung von weiteren *Trichophyton*-Arten sowie *Microsporum*- und *Epidermophyton*-Spezies wurde Mix II des DermaGenius® 2.0 Complete multiplex-Kits genutzt. Hiermit können sowohl *T. benhamiae* und *T. ver-*

Tabelle 3

Klinisch isolierte Dermatophyten. Die aufgelisteten Dermatophyten wurden mittels PCR-ELISA und/oder Sequenzierung (Seq.) identifiziert. Deren DNA wurde aus Hautschuppen beziehungsweise Kulturen isoliert. Der routinediagnostischen Untersuchung stehen die Real-Time-PCR-Ergebnisse mit entsprechenden Schmelzpeak-Temperaturen gegenüber. Die Farben in der letzten Spalte entsprechen den Farben der Grafiken aus Abbildung 2. Weiß gekennzeichnete Proben sind nicht in Abbildung 2 dargestellt

#	Labor-nummer	Dermatophyt (PCR-ELISA/Seq.)	Material	Real-Time-PCR-Ergebnisse	Schmelzpeak-Temperatur (°C)	
1	211261/16	<i>T. rubrum</i>	Kultur	<i>T. rubrum</i>	58,73	
2	208704/17	<i>T. rubrum</i>	Kultur	<i>T. rubrum</i>	58,16	
3	208839/17	<i>T. rubrum</i>	Kultur	<i>T. rubrum</i>	58,19	
4	209574/16	<i>T. soudanense</i>	Kultur	<i>T. rubrum</i>	58,26	
5	211734/16	<i>T. violaceum</i>	Kultur	<i>T. violaceum</i>	68,53	
6	209486/17	<i>T. violaceum</i>	Kultur	<i>T. violaceum</i>	68,86	
7	209486/17	<i>T. violaceum</i>	Hautschuppen	<i>T. violaceum</i>	68,62	
8	209851/17	<i>T. violaceum</i>	Kultur	<i>T. violaceum</i>	68,91	
9	209851/17	<i>T. violaceum</i>	Hautschuppen	<i>T. violaceum</i>	68,72	
10	210287/16	<i>T. interdigitale</i> ITS-Typ II	Kultur	<i>T. interdigitale</i>	71,44	
11	211301/17	<i>T. interdigitale</i> ITS-Typ II	Kultur	<i>T. interdigitale</i>	71,59	
12	200003/16	<i>T. mentagrophytes</i> ITS-Typ III	Kultur	<i>T. interdigitale</i>	70,83	
13	216500/17	<i>T. mentagrophytes</i> ITS-Typ VIII	Kultur	<i>T. interdigitale</i>	72,18	
14	216105/17	<i>T. mentagrophytes</i> ITS-Typ III*	Kultur	<i>T. interdigitale</i>	72,34	
15	213007/17	<i>T. mentagrophytes</i> ITS-Typ III*	Hautschuppen	<i>T. interdigitale</i>	71,31	
16	203245/16	<i>T. quinckeanum</i>	Kultur	<i>T. interdigitale</i>	72,89	
17	217002/17	<i>T. quinckeanum</i>	Kultur	<i>T. interdigitale</i>	73,19	
18	212014/16	<i>T. mentagrophytes</i> ITS-Typ VII	Kultur	<i>T. mentagrophytes</i>	78,52	
19	200617/17	<i>T. mentagrophytes</i> ITS-Typ IV	Kultur	<i>T. mentagrophytes</i>	78,70	
20	212104/16	<i>T. tonsurans</i>	Kultur	<i>T. tonsurans</i>	76,27	
21	211194/17	<i>T. tonsurans</i>	Hautschuppen	<i>T. tonsurans</i>	76,97	
22	211195/17	<i>T. tonsurans</i>	Hautschuppen	<i>T. tonsurans</i>	76,97	
23	212117/17	<i>T. tonsurans</i>	Hautschuppen	<i>T. tonsurans</i>	76,38	
24	212373/17	<i>T. tonsurans</i>	Hautschuppen	<i>T. tonsurans</i>	76,56	
25	214546/15	<i>T. equinum</i>	Kultur	<i>T. tonsurans</i>	76,86	
26	212860/16	<i>T. schoenleinii</i>	Kultur	<i>T. mentagrophytes</i>	78,53	
27	210362/16	<i>T. benhamiae</i> gelb	Kultur	<i>T. benhamiae</i>	69,93	
28	214733/16	<i>T. benhamiae</i> weiß	Kultur	<i>T. benhamiae</i>	69,14	
29	109095/17	<i>T. benhamiae</i>	Hautschuppen	<i>T. benhamiae</i>	69,90	
30	109711/17	<i>T. benhamiae</i>	Hautschuppen	<i>T. benhamiae</i>	69,91	
31	209402/17	<i>T. benhamiae</i>	Hautschuppen	<i>T. benhamiae</i>	69,80	
32	211234/17	<i>T. benhamiae</i>	Hautschuppen	<i>T. benhamiae</i>	70,06	
33	211281/17	<i>T. benhamiae</i>	Hautschuppen	<i>T. benhamiae</i>	70,15	
34	109271/16	<i>T. erinacei</i>	Kultur	<i>T. benhamiae</i>	69,70	
35	218315/17	<i>T. erinacei</i>	Kultur	<i>T. benhamiae</i>	70,82	
36	208569/16	<i>T. verrucosum</i>	Kultur	<i>T. verrucosum</i>	75,77	
37	210837/17	<i>T. verrucosum</i>	Hautschuppen	<i>T. verrucosum</i>	75,41	
38	210838/17	<i>T. verrucosum</i>	Hautschuppen	<i>T. verrucosum</i>	75,52	
39	211071/17	<i>T. verrucosum</i>	Hautschuppen	<i>T. verrucosum</i>	75,49	
40	211472/17	<i>T. verrucosum</i>	Hautschuppen	<i>T. verrucosum</i>	75,32	
41	212741/16	<i>M. canis</i>	Kultur	<i>M. canis</i>	68,09	
42	210839/17	<i>M. canis</i>	Hautschuppen	<i>M. canis</i>	68,39	
43	212266/17	<i>M. canis</i>	Hautschuppen	<i>M. canis</i>	68,52	
44	212545/17	<i>M. canis</i>	Hautschuppen	<i>M. canis</i>	68,48	
45	212648/17	<i>M. canis</i>	Hautschuppen	<i>M. canis</i>	68,64	
46	900975/17	<i>M. canis</i>	Hautschuppen	<i>M. canis</i>	68,60	
47	208361/16	<i>M. ferrugineum</i>	Kultur	<i>M. canis</i>	68,62	
48	215925/16	<i>M. audouinii</i>	Kultur	<i>M. audouinii</i>	60,02	
49	210163/16	<i>E. floccosum</i>	Kultur	<i>E. floccosum</i>	69,55	

T. = Trichophyton; M. = Microsporium; E. = Epidermophyton; * siehe Literaturliste 18 und 19

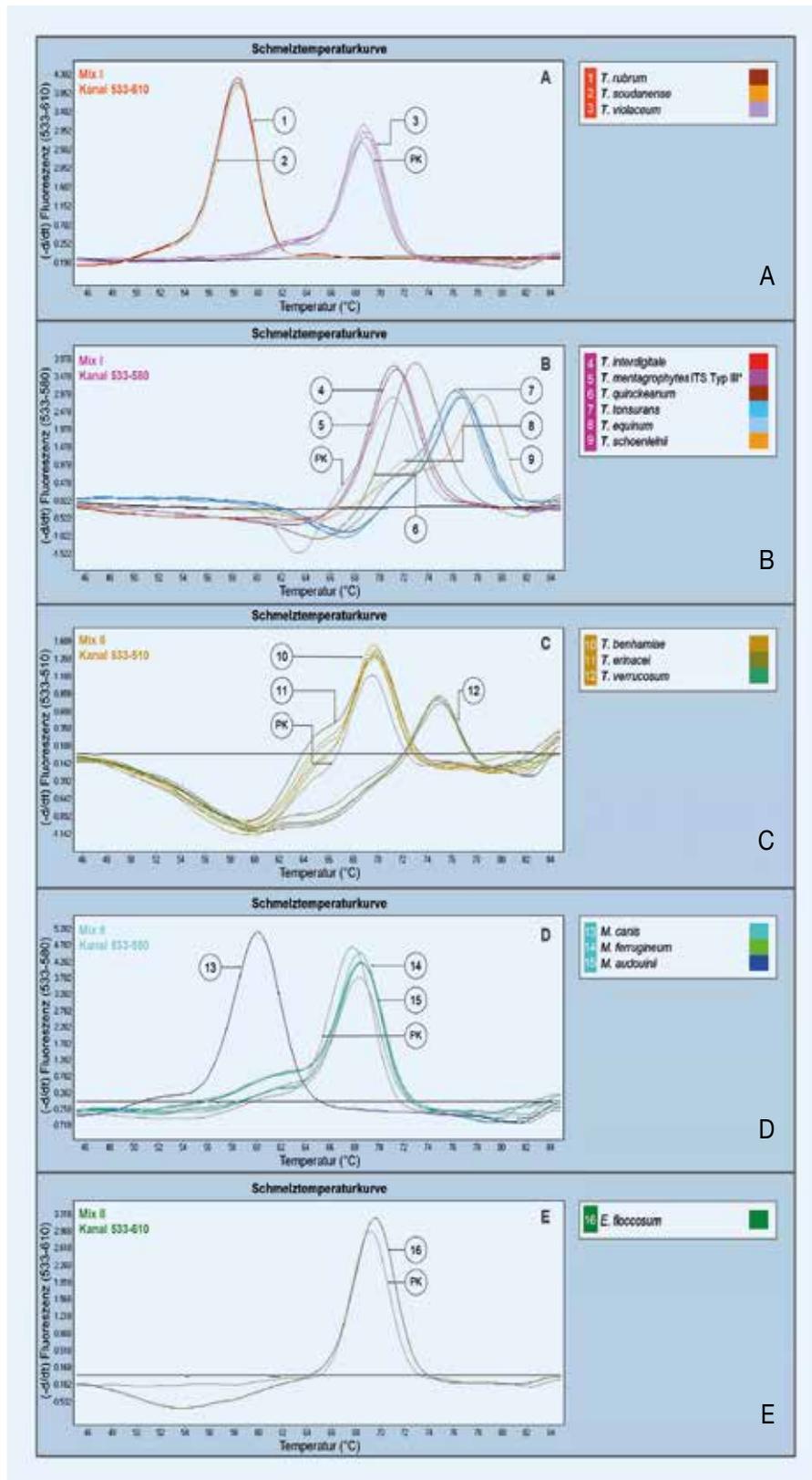


Abb. 2: a-e Schmelztemperaturkurven der Dermatophyten-Proben. Mithilfe der DermaGenius® 2.0 Nail (Mix I) und Complete (Mix II) multiplex Real-Time-PCR-Kits wurden die Proben in den entsprechenden Fluoreszenzkanälen analysiert: Mix I – Kanal 533–610 (A) und 533–580 (B), Mix II – Kanal 533–510 (C), 533–580 (D) sowie 533-610 (E). Dabei entsprechen die Farben der Grafiken A bis E den Farben der letzten Spalte von Tabelle 3. Positivkontrollen (PK) sind grau dargestellt und Negativkontrollen schwarz

rucosum, M. canis und M. audouinii als auch E. floccosum detektiert werden. Die verwendeten Sonden können seltene Dermatophyten-Arten mit den gleichen Schmelzpeak-Temperaturen wie die angegebenen DermaGenius® 2.0-Targets nicht unterscheiden (Tab. 2).

Als Positivkontrollen dienten die in den Kits enthaltenen Positivkontrollen. Eine mitgelieferte interne Kontrolle wurde verwendet, um die DNA-Amplifikation zu überprüfen und somit falsch-negative Proben zu erkennen.

Ergebnisse

Erkennung von Trichophyton spp., Microsporum spp. und Epidermophyton spp. aus klinisch isolierten Hautproben und Kulturen

Obwohl *T. rubrum* als der häufigste humanpathogene Erreger einer Dermatophytose gilt (13), kann vor allem eine entzündliche Tinea corporis, Tinea manuum oder Tinea capitis auch von weiteren, oft zoophilen Dermatophyten-Arten verursacht werden, wie zum Beispiel *T. mentagrophytes*, *T. benhamiae* oder *M. canis*. Auch seltene Dermatophyten-Arten kommen zunehmend in Deutschland vor und sollten in der mykologischen Diagnostik berücksichtigt werden. Zu letzteren zählen beispielsweise der »Igelpilz« *T. erinacei*, der zoophile Erreger *T. quinckeanum* (Abb. 1), der meist von Katzen auf den Menschen übertragen wird, sowie *M. ferrugineum* und *T. soudanense*, die häufig bei Migranten diagnostiziert werden (14–16).

Zum Vergleich von Real-Time-PCR und Standardnachweismethoden wurden daher 16 verschiedene Dermatophyten-Spezies verwendet, die aus 21 klinisch isolierten Hautproben und 28 Kulturen routinediagnostisch nachgewiesen wurden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von Kolonien verschiedener Dermatophyten-Arten beziehungsweise ITS-Genotyp-Varianten (vgl. Bei-

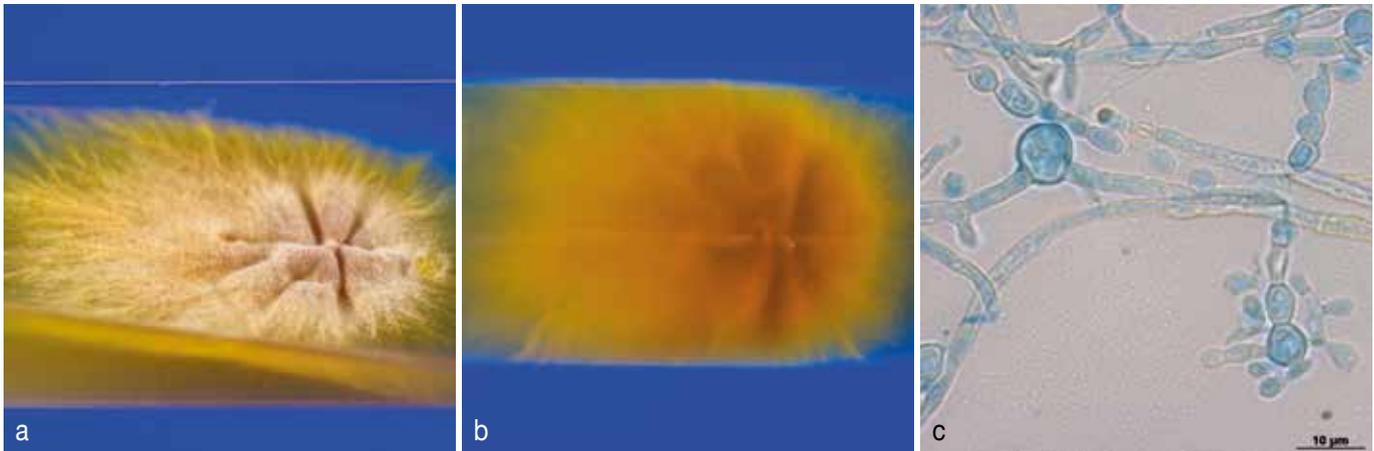


Abb. 3a–c: Kultur und Mikroskopie von *T. soudanense*. a) Vorder- und b) Rückseite der Primärkultur auf Sabouraud-4%-Glukose-Agar. Gelbe Kolonie mit peripheren Hyphenbündeln. c) Mikroskopisch zeigt *T. soudanense* große Chlamydosporen sowie schmale, birnenförmige Mikrokonidien in Akladiumform. Der Patient mit der Labornummer 209574/16 war 5 Jahre alt, weiblich, aus Angola stammend und zeigte *Tinea unguium* und *Tinea capitis* (20)

spiel in Abb. 1) und der damit verbundenen erschwerten kulturellen Unterscheidung wurden die Dermatophyten-Kulturen zusätzlich durch Sequenzierung der ITS-Region der rDNA und des *TEF1 α* -Gens identifiziert (Tab. 3).

Alle 49 klinischen Hautschuppen und Kulturen wurden mithilfe des DermaGenius® 2.0 Complete multiplex Real-Time-PCR-Assays detektiert. Davon konnten 37 (~76 %) anhand ihrer spezifischen Schmelzpeak-Temperatur identifiziert werden (Abb. 1 u. Tab. 3).

14 Proben zeigten eine Schmelzkurve, konnten jedoch nicht unterschieden werden. Dazu zählen *T. soudanense* (n = 1), der als *T. rubrum* identifiziert wurde, *T. erinacei* (n = 2) als *T. benhamiae*, *T. equinum* (n = 1) als *T. tonsurans* und *M. ferrugineum* (n = 1) als *M. canis* (Tab. 3).

Obwohl verschiedene *T. mentagrophytes*-ITS-Genotyp-Varianten (n = 4), *T. quinckeanum* (n = 2) und *T. schoenleinii* (n = 1) in der Real-Time-PCR ebenfalls eine Schmelzkurve zeigten, ließen sich deren Schmelzpeak-Temperaturen nicht von *T. interdigitale* oder *T. mentagrophytes* unterscheiden. Somit konnten aufgrund der gleichen Schmelzpeak-Temperaturen (Tab. 2) insgesamt 9 der 16 getesteten Dermatophyten-Spezies mittels Real-Time-PCR identifiziert werden.

Schlussfolgerung

Mithilfe dieser Studie wurde gezeigt, dass das DermaGenius® 2.0 multiplex Real-Time-PCR-Assay die am häufigsten isolierten und klinisch relevanten Dermatophyten nachweisen kann. Dabei unterscheidet sich der Erregernachweis aus nativen Hautschuppen nicht von den Ergebnissen der Pilz-Kulturanalyse. Die Kits sind somit für routinediagnostische Labore, Hautkliniken und auch dermatologische Praxen geeignet (17). Sie sind robust und benötigen einen geringen Zeitaufwand. Das DermaGenius® 2.0 Nail multiplex Real-Time-PCR-Assay zeigte bereits in einer vorangegangenen Studie eine diagnostische Empfindlichkeit sowie Spezifität, die vergleichbar mit den Ergebnissen des histopathologischen Pilznachweises in Kombination mit der Kulturverfärbung waren (7).

Dennoch sind die Identifizierung und Differenzierung seltener Dermatophyten sowie verschiedener, neu beschriebener ITS-Genotyp-Varianten von *T. mentagrophytes* und *T. interdigitale* anspruchsvoll (18, 19). Eine hohe phylogenetische Verwandtschaft führt hier zu gleichen Schmelzpeak-Temperaturen (Tab. 2), die keine eindeutige Dermatophyten-Differenzierung zulassen. Beispielsweise lassen sich *T. rubrum* und *T. soudanense* allein durch die Schmelzpeak-Temperaturanalyse der

Real-Time-PCR nicht unterscheiden (Abb. 2a u. Tab. 3). Jedoch zeigt *T. soudanense* eine charakteristische Kulturmorphologie und -färbung (Abb. 3a u. b), die sich eindeutig von *T. rubrum* differenziert. Auch mikroskopisch dienen die großen Chlamydosporen von *T. soudanense* (Abb. 3c) sowie die Abwesenheit von Makrokonidien als Unterscheidungshilfe gegenüber *T. rubrum*.

Der Abnahmeort (Lokalisation der vermuteten Dermatophytose, z.B. Verdachtsdiagnose *Tinea capitis*) und die Patientenanamnese (geografische Herkunft des Patienten, z.B. Kind von Migranten aus Ostafrika etc.) sind zusätzlich sehr hilfreich für die Dermatophyten-Differenzierung: *T. rubrum* gilt als häufigster Dermatophyt und befällt hauptsächlich Nägel und Fußhaut, wohingegen *T. soudanense* oft eine *Tinea capitis*/*Tinea corporis* hervorruft und in Afrika weit verbreitet ist.

Wie bereits von Sherman et al. (8) gezeigt wurde, gilt die Multiplex-Real-Time-PCR als schnelle und effiziente Methode zur Identifizierung klinisch relevanter Dermatophyten-Arten. Hier erzielten die Real-Time-PCR sowie die konventionellen Nachweis-Methoden in 85 % der Fälle das gleiche Ergebnis. Proben, die zum Beispiel aufgrund von Mischkulturen nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurden zusätz-

lich sequenziert, wobei die Ergebnisse größtenteils mit den Ergebnissen der Real-Time-PCR übereinstimmen. Die Verwendung konventioneller Methoden in Kombination mit der Real-Time-PCR zeigte sich bereits als effiziente Nachweismethode in der Dermatomykologie (7).

Insgesamt eignet sich die Real-Time-PCR zur Unterstützung der Dermatophyten-Diagnostik einschließlich ihrer Kultivierung und Mikroskopie und benötigt optimaler Weise die Einbeziehung der Patientenanamnese und des Abnahmeortes der Probe. Seltene Dermatophyten oder spezielle ITS-Genotyp-Varianten können letztendlich nur mithilfe der DNA-Sequenzierung, die heute in spezialisierten Laboren auch für die Routinediagnostik verfügbar ist, eindeutig identifiziert werden.

Literatur

- Nenoff P, Krüger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ (2014): Mykologie – ein Update. Teil I: Dermatomykosen: Erreger, Epidemiologie und Pathogenese. J Dtsch Dermatol Ges 12, 188–211; quiz 212
- Gräser Y, El Fari M, Vilgalys R, Kuijpers AF, De Hoog GS, Presber W, Tietz H (1999): Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. Med Mycol 37 (2), 105–114
- Wiegand C, Bauer A, Brasch J, Nenoff P, Schaller M, Maysner P, Hipler UC, Elsner P (2016): Sind die klassischen Methoden zur mykologischen Diagnostik noch »state-of-the-art«? J Dtsch Dermatol Ges 14, 490–494
- Nenoff P, Uhrlaß S (2018): Klassische oder molekulare Diagnostik von Hautinfektionen? Erreger-adaptierte Behandlung von Mykosen. In: Ausgewählte Aspekte der Individualisierten Medizin. Festsymposium der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig anlässlich des 80. Geburtstages von Altpräsident OM Prof. Dr. Uwe-Frithjof Haustein am 31. März 2017 in Leipzig. Hrsg: Mössner J, Haustein UF: Abhandlungen der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse. Band 66, Heft 3, 43–52. Hirzel, Stuttgart, Leipzig
- Sharma R, Gupta S, Asati DP, Karuna T, Purwar S, Biswas D (2017): A pilot study for the evaluation of PCR as a diagnostic tool in patients with suspected dermatophytoses. Indian Dermatol Online J 8 (3), 176–180
- Winter I, Uhrlaß S, Krüger C, Herrmann J, Bezold G, Winter A, Barth S, Simon JC, Gräser Y, Nenoff P (2013): 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 64, 283–289
- Hayette MP, Seidel L, Adjetej C, Darfouf R, Wéry M, Boreux R, Sacheli R, Melin P, Arrese J (2018): Clinical evaluation of the DermaGenius® Nail real-time PCR assay for the detection of dermatophytes and *Candida albicans* in nails. Med Mycol May 11. doi: 10.1093/mmy/myy020. Epub ahead of print
- Sherman S, Goshen M, Treigerman O, Ben-Zion K, Carp MJ, Maisler N, Binsky Ehrenreich I, Kimchi A, Lifshitz S, Smollan G, Davidovici B, David M, Hodak E, Segal R (2018): Evaluation of multiplex real-time PCR for identifying dermatophytes in clinical samples – a multicentre study. Mycoses 61 (2), 119–126
- Lubis NZ, Muis K, Nasution LH (2018): Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism as a Confirmatory Test for Onychomycosis. Open Access Maced J Med Sci 6 (2), 280–283
- 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 (2), 282–295
- Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Rezaei-Matehkolaei A, Najafzadeh MJ, Umeda Y, Ahmadi B (2015): Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. Med Mycol 53, 215–224
- Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, de Hoog GS, Shidfar MR, Satoh K, Najafzadeh MJ, Mirhendi H (2012): Multilocus differentiation of the related dermatophytes *Microsporum canis*, *Microsporum ferrugineum* and *Microsporum audouinii*. J Med Microbiol 61 (Pt 1), 57–63
- Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B (2008): Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. Mycopathologia 166, 335–352
- Kargl A, Kosse B, Uhrlaß S, Koch D, Krüger C, Eckert K, Nenoff P (2018): Igelpilze in Münchner Hautarztpraxis – Fallbeschreibungen und Übersicht. Hautarzt 69, 576–585
- Uhrlaß S, Schroedl W, Mehlhorn C, Krüger C, Hubka V, Maier T, Gräser Y, Paasch U, Nenoff P (2018): Molekulare Epidemiologie von *Trichophyton quinckeanum* – ein zoophiler Dermatophyt im Aufwind. J Dtsch Dermatol Ges 16 (1), 21–33
- Uhrlaß S, Ranke-Greve I, Cleffmann U, Gebhardt M, Baunacke A, Friedrichs C, Koch D, Krüger C, Nenoff P (2018): *Microsporum ferrugineum* – die Renaissance eines vergessenen Dermatophyten. J Dtsch Dermatol Ges 16 (Suppl 1), 5–6
- Wittig F, Uhrlaß S, Gaajetaan G, Dingemans G, Krüger C, Nenoff P (2018): Detection and identification of pathogenic dermatophytes using multiplex real-time PCR assays. Mycoses 61 (Suppl 1), 25
- Uhrlaß S, Pchelin IM, Rezaei-Matehkolaei A, Verma SB, Vasani R, Koch D, Wittig F, Krüger C, Nenoff P (2018): Molecular epidemiology of *Trichophyton mentagrophytes* – a new approach. Medical Mycology 56 (S2), PP3.142
- Nenoff P, Verma SB, Uhrlaß S, Burmester A, Gräser Y (2019): A clarion call for preventing taxonomical errors of dermatophytes using the example of the novel *Trichophyton mentagrophytes* genotype VIII uniformly isolated in the Indian epidemic of superficial dermatophytosis. Mycoses 62 (1), 6–10. Epub 2018 Oct 1
- Nenoff P, Krüger C, Schulze I, Koch D, Rahmig N, Hipler UC, Uhrlaß S (2018): Tinea capitis und Onychomykose durch *Trichophyton soudanense* bei zwei Geschwistern aus Angola – erfolgreiche Behandlung mit Fluconazol. Patientenbeschreibungen in Deutschland und Übersicht über die Literatur. Hautarzt 69 (9), 737–750

Anschrift für die Verfasser:

*Franziska Wittig, M.Sc.
Labor für Medizinische Mikrobiologie
Mölbiser Hauptstraße 8
04571 Rötha OT Mölbis
E-Mail f.wittig@
mykologie-experten.de*