

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie
des Universitätsklinikums Freiburg im Breisgau

Molekulare Methoden zum Erreger-Nachweis bei Dermatomykosen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2020

von Vera Bußmann

geboren in Münster (Westf.)

Dekan: Prof. Dr. Norbert Südkamp
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Cassian Sitaru
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Häcker
Jahr der Promotion: 2020

*Für
Dr. med. Jan Bußmann*

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	1
2	Abbildungsverzeichnis.....	3
3	Tabellenverzeichnis.....	4
4	Einleitung.....	5
4.1	Dermatomykosen.....	5
4.1.1	Erreger.....	5
4.1.2	Klinische Erscheinungsformen.....	6
4.1.3	Klinische Bedeutung.....	7
4.1.4	Virulenzfaktoren.....	10
4.1.5	Therapie.....	10
4.2	Diagnostik.....	12
4.2.1	Herkömmliche Diagnostik.....	12
4.2.2	Molekulare Diagnostik.....	16
4.2.2.1	DNA-Isolierung.....	17
4.2.2.2	PCR.....	17
4.2.2.3	Real-time PCR.....	20
5	Zielsetzung.....	24
5.1	Ziele dieser Arbeit.....	24
5.2	Auswahl der Methoden.....	24
6	Material und Methoden.....	26
6.1	Material.....	26
6.1.1	Geräte.....	26
6.1.2	Software.....	26
6.1.3	Reagenzien.....	27
6.1.4	Datenbanken.....	27
6.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	28
6.1.6	Proben.....	28
6.2	Methoden.....	29
6.2.1	Konventionelle Diagnostik.....	29
6.2.2	DNA-Isolierung.....	30
6.2.3	PCR.....	31

6.2.3.1	In-house Methode nach Bergmans et al.....	31
6.2.3.2	FTD Dermatophytes (Fast Track Diagnostics).....	34
6.2.3.3	Mentype® MycoDermQS Lateral Flow (Biotype Diagnostic GmbH).....	36
6.2.3.4	Erreger-Spektrum der PCR-Methoden.....	38
6.2.3.5	Auswertungskriterien.....	40
6.2.3.6	Statistik.....	40
7	Ergebnisse.....	41
7.1	Testungen mit Ringversuchsproben.....	41
7.2	Sensitivität und Spezifität.....	41
7.3	Erreger-Spektrum.....	47
7.4	Misch-Infektionen.....	49
7.5	Praktikabilität.....	50
8	Diskussion.....	52
9	Zusammenfassung.....	63
10	Literaturverzeichnis.....	64
11	Publikation.....	71
12	Lebenslauf.....	72
13	Eidesstattliche Versicherung.....	74
14	Danksagung.....	75

1 Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arthroderma</i>
bzw.	beziehungsweise
Ct	Cycle threshold value
C.	<i>Candida</i>
DLSO	Distal-laterale subunguale Onychomykose
DNA	deoxyribonucleic acid (= Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTM	Dermatophyte test medium
E.	<i>Epidermophyton</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FTD	Fast Track Diagnostics
IC	Interne Kontrolle
ICG	Immunchromatographie-Streifentest
ITS	Internal Transcribed Spacer
KOH	Kaliumhydroxid
M.	<i>Microsporum</i>
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
Mg	Magnesium
NC	Negativkontrolle
<i>NDM</i>	<i>Non-Dermatophyte Molds</i>
neg	negativ
NPV	Negativ Prädiktiver Wert
OM	Onychomykose

PAS	Periodic acid-Schiff reaction
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PC	Positivkontrolle
PCR	Polymerase chain reaction (= Polymerase-Ketten-Reaktion)
pos	positiv
PPV	Positiv Prädiktiver Wert
PSO	Proximale subunguale Onychomykose
rDNA	ribosomale DNA
RNA	ribonucleic acid (= Ribonukleinsäure)
ROC	Receiver Operating Characteristic
RV	Ringversuch
<i>spp.</i>	Spezies
<i>T.</i>	<i>Trichophyton</i>
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
TDO	Total dystrophische Onychomykose
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
WSO	Weiße superfizielle Onychomykose

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht PCR Zyklus.....	19
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines <i>LightCycler</i> ® (Roche) (82).....	21
Abbildung 3: Funktionsprinzip der Hybridisierungssonden.....	22
Abbildung 4: Diagnostischer Algorithmus.....	28
Abbildung 5: Typische Kurvenverläufe der Real-time PCR-Methoden.....	34
Abbildung 6: Auswertung Mentype® MycoDermQS Lateral Flow.....	37
Abbildung 7: Positiv-Raten der verschiedenen Methoden.....	41
Abbildung 8: Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Methoden (Referenzmethode Kultur).....	42
Abbildung 9: Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Methoden (Referenzmethode Kultur und/oder mind. eine PCR).....	44
Abbildung 10: Häufigkeit der Erreger.....	47
Abbildung 11: Am häufigsten nachgewiesene Erreger für die einzelnen Methoden.....	47
Abbildung 12: Darstellung der Methoden analog einer ROC-Kurve.....	53

3 Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Dermatophyten nach epidemiologischen Gesichtspunkten (modifiziert aus Hof, Dörries (2)).....	4
Tabelle 2: Prävalenzen in verschiedenen Risiko-Gruppen (30).....	8
Tabelle 3: Gütekriterien der Methoden nach Velasquez et al. (59).....	14
Tabelle 4: Geräte.....	26
Tabelle 5: Software.....	26
Tabelle 6: Reagenzien.....	27
Tabelle 7: Datenbanken.....	27
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 9: Primer Bergmans et al.....	32
Tabelle 10: PCR Master Mix.....	33
Tabelle 11: PCR Protokoll Bergmans et al.....	33
Tabelle 12: Auswertungstabelle FTD Dermatophytes.....	38
Tabelle 13: Erreger-Spektrum der PCR-Methoden.....	40
Tabelle 14: Auswertungskriterien.....	41
Tabelle 15: Ergebnisse mit Ringversuchen.....	43
Tabelle 16: Sensitivität und Spezifität (Referenzmethode Kultur).....	45
Tabelle 17: Positiv und Negativ Prädiktiver Wert (Referenzmethode Kultur).....	45
Tabelle 18: Sensitivität und Spezifität (Referenzmethode Kultur und/oder mind. eine PCR).....	46
Tabelle 19: Positiv und Negativ Prädiktiver Wert (Referenzmethode Kultur und/oder mind. eine PCR).....	47
Tabelle 20: Detaillierter Vergleich der Ergebnisse für Bergmans et al.....	48
Tabelle 21: Detaillierter Vergleich der Ergebnisse für FTD Dermatophytes.....	48
Tabelle 22: Detaillierter Vergleich der Ergebnisse für MycoDerm.....	48
Tabelle 23: Detaillierter Vergleich der Ergebnisse für alle PCR-Methoden zusammengefasst.....	50
Tabelle 24: Misch-Infektionen mit Pseudomonas.....	53
Tabelle 25: Praktikabilität der Methoden.....	54
Tabelle 26: Schmelzpunkte Bergmans et al(72).....	56

4 Einleitung

4.1 Dermatomykosen

4.1.1 Erreger

Die humanpathogenen Pilze lassen sich nach dem DHS-System in drei Gruppen einteilen: Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze. Dermatomykosen werden hauptsächlich von Dermatophyten verursacht. Diese Fadenpilze verwerten Keratin als wesentlichen Nährstoff. Daher befallen sie fast ausschließlich die Haut und ihre Anhangsgebilde (Haare und Nägel). Nur in seltenen Fällen sind auch Dermis und Subkutis betroffen. Dermatophyten werden anhand mikroskopischer Eigenschaften in die drei Gattungen *Trichophyton* (*T.*), *Microsporum* (*M.*) und *Epidermophyton* (*E.*) gegliedert. Durch zunehmende molekularbiologische Typisierung ist diese Einteilung allerdings im Umbruch. Eine weitere Art der Gliederung ist die nach Erregerreservoir. So werden die anthropophilen Dermatophyten von Mensch zu Mensch übertragen. Sie haben die höchste Kontagiösität, dafür ist die klinische Ausprägung meist eher mild. Anders ist dies bei zoophilen Erregern. Hier sind Fell-tragende Tiere das Reservoir und die Übertragung erfolgt vom Tier auf den Menschen. Dabei sind erhebliche entzündliche Begleitreaktionen zu beobachten. Außerdem gibt es noch geophile Arten, die als Saprophyten in der Erde leben. Die Übertragung erfolgt dann z.B. bei der Gartenarbeit. Einige Beispiele für geo-, zoo- und anthropophile Erreger sind in Tabelle 1 aufgeführt [1,2].

Tabelle 1: Einteilung der Dermatophyten nach epidemiologischen Gesichtspunkten (modifiziert aus Hof, Dörries [2])

Erregerquelle	Beispiel	Infektkette
Erboden (geophil)	<i>M. gypseum</i> <i>T. terrestre</i>	Erde → Mensch
Tier (zoophil)	<i>M. canis</i> <i>M. equinum</i>	Tier → Mensch
Menschen (anthropophil)	<i>E. floccosum</i> <i>T. interdigitale</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. tonsurans</i>	Mensch → Mensch

Taxonomie:	
Reich:	<i>Fungi</i>
Abteilung:	<i>Ascomycota</i>
Klasse:	<i>Deuteromyces</i>
Ordnung:	<i>Onygenales</i>
Familie:	<i>Arthrodermataceae</i>
Gattung:	<i>Trichophyton</i>
Spezies:	<i>rubrum</i>

Die Verteilung der Erreger variiert stark je nach Region und Krankheitsbild. So gibt es Zahlen aus Deutschland für die Onychomykose, die einen Anteil der Dermatophyten von 68 %, der Hefen von 29 % und der Schimmelpilze von 3 % zeigen [3]. Schimmelpilze werden in diesem Zusammenhang auch als *Non-Dermatophyte Molds* (NDM) bezeichnet. Eine sehr große Studie in Kanada gibt 71,9 % Dermatophyten, 20,4 % Schimmelpilze und 7,6 % Hefen an [4]. Wieder andere Zahlen aus England lauten wie folgt: Dermatophyten 91,9 %, NDM 5,6 %, Hefen 2,5 % [5]. Unter den Dermatophyten ist *T. rubrum* der häufigste Erreger mit 85 %, bei der Onychomykose sogar bis zu 91 %. Darauf folgt *T. mentagrophytes* bzw. *T. interdigitale* mit ungefähr 7 %. Unter den Hefen sind *Candida spp.* mit 90 % führend; bei den Schimmelpilzen ist es *Scopulariopsis brevicaulis* mit rund 43 %, gefolgt von *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.* und *Fusarium spp.* [3,6].

4.1.2 Klinische Erscheinungsformen

Dermatomykosen zeigen je nach Erreger und Lokalisation sehr variable klinische Bilder. Der Begriff „Tinea“ (aus dem lateinischen: „Motte“, Raupe“) ist ausschließlich einer Infektion mit Dermatophyten vorbehalten. Die mit Abstand häufigste Form ist die Tinea pedis, welche vor allem in den Zehen-Zwischenräumen auftritt (interdigitale) aber auch von den Fußsohlen ausgehend über die Fußkanten zum Fußrücken ziehen kann (squamös-hyperkeratotisch, Mokassin-Mykose) oder sich als juckende, eintrocknende Bläschen am Fußrücken darstellt (vesikulös-dyshidrotisch) [7]. Häufigster Erreger ist *T. rubrum*. Eine Infektion an der Hand wird als Tinea manuum bezeichnet.

Tinea capitis bzw. corporis bezeichnen Infektionen an Kopf und Körper. Ihre, sich zentrifugal ausbreitenden, erythematosquamösen Plaques waren namensgebend und werden auch heute noch im Englischen als „ringworm“ bezeichnet. Infektionen bei Erwachsenen sind oft anthropophil durch *T. rubrum*, gefolgt von *T. interdigitale*. Der

Ansteckungsweg bei Kindern hingegen ist oft zoophil über Haustiere, vor allem Katzen und Nagetiere wie Meerschweinchen [8]. Hierbei kommt es durch die nicht wirtsadaptierten Erreger zu deutlich stärkeren inflammatorischen Begleitreaktionen [1,9]. In den letzten Jahren jedoch sind u.a. in Großbritannien und den USA vermehrt Fälle von *Tinea capitis* durch *T. tonsurans* bei Ringern aufgetreten (sog. *Tinea gladiatorum*). Interessante Faktoren scheinen hierbei die Übertragung durch Matten und die hohe Anzahl an asymptomatischen Trägern zu sein (bis zu 44,5 %) [10–12].

Sind die Nägel an Hand oder Fuß betroffen, spricht man von einer Onychomykose. Diese wird in den meisten Fällen von Dermatophyten ausgelöst und darf dann als *Tinea unguium* bezeichnet werden. Andere Erreger sind Hefen oder Schimmelpilze. Die Onychomykose ist mit 94,8 % bzw. einem Faktor von 10,6 wesentlich häufiger an den Füßen zu finden [5,13] und oft mit *Tinea pedis* vergesellschaftet (33,8 %) [14,15]. Es gibt vier typische Formen der Onychomykose: Die mit Abstand häufigste ist die distal-laterale subunguale Onychomykose (DLSO). Dabei kommt es zu einer Invasion des Nagelbettes und der Unterseite der Nagelplatte. Sichtbar wird dies durch Onycholyse und eine Verdickung des subungualen Bereichs. Die proximale subunguale Onychomykose (PSO) ist seltener und kommt meist bei Immunsupprimierten vor. Hier erfolgt die Invasion über die proximale Nagelfalte. Eine weitere Variante ist die weiße superfizielle Onychomykose (WSO), die auch als *Leukonychia trichophytica* bezeichnet wird. Eine direkte Einwanderung der Erreger in die Oberfläche der Nagelplatte wird durch weiße Inseln sichtbar. Als Maximalvariante bzw. Endzustand gibt es noch die Total dystrophische Onychomykose (TDO), die mit einer Zerstörung der gesamten Nageleinheit einhergeht [16].

Infektionen mehrerer Körperstellen gleichzeitig können zu Syndromen zusammengefasst werden, wie z.B. das „two feet, one hand“- Syndrom. Hierbei kommt es durch Kratzen zu einer Autoinokulation von den Füßen auf die (meist) rechte Hand. Weiteres Beispiel ist das *Trichopyton-rubrum*-Syndrom, welches eine Infektion von mindestens vier Körperstellen beschreibt (palmar, plantar, Nägel und mindestens eine weitere Stelle) [17,18].

4.1.3 Klinische Bedeutung

Dermatomykosen sind weltweit verbreitete Erkrankungen mit zunehmender Prävalenz. Es wird geschätzt, dass 20-25 % der Weltbevölkerung darunter leidet [19].

Die häufigste Form ist dabei in den westlichen Ländern die Onychomykose. Ihre Prävalenz wird in Deutschland auf 12,4 % geschätzt [3] und sie ist für 30-40 % der Fußkrankheiten und ca. 50 % der Nagelerkrankungen verantwortlich [20,21]. In einem Vergleich von 21 Studien aus der ganzen Welt war die durchschnittlich angegebene Prävalenz 11,4 % [13]. In Kanada wurde 2016 bei einer großen Studie (15000 Patienten) ein Wert von 6,4 % ermittelt [4].

Gründe für die steigende Prävalenz werden in der zunehmenden Zahl immunsupprimierter Patienten gesehen (z.B. durch HIV-Infektionen, Chemotherapie und immunsupprimierende Therapien nach Transplantationen) sowie in einer alternden Gesellschaft und einer vermehrten Nutzung von Schwimmbädern, Fitness-Studios und geschlossenen Schuhen [22].

Es gibt eine Vielzahl an Risikofaktoren für eine Dermatomykose. Neben dem schon erwähnten Aspekt der Immunsuppression ist vor allem das Alter einer der Hauptfaktoren [23]. Weitere sind Diabetes mellitus, periphere arterielle Verschlusskrankheit und Nageldystrophien bzw. Traumata an den Nägeln. Widersprüchliche Meinungen herrschen in der Literatur zu Psoriasis und der Geschlechterverteilung [17,24–26]. Auch eine genetische Komponente ist nicht von der Hand zu weisen. So haben (im gleichen Haushalt lebende) Kinder von Betroffenen eine deutlich höhere Infektionsrate als angeheiratete Partner, was Zaias et al. an einen autosomal-dominanten Übertragungsweg hat denken lassen [23,27].

Eine nicht zu unterschätzende Risiko-Gruppe stellen Sportler dar. Durch repetitive Traumata, okklusives Schuhwerk und Hyperhidrose findet man z.B. bei Fußballern bei bis zu 60,7 % eine Onychomykose und 36,9 % eine Tinea pedis [28]. Kontaktsportarten wie Judo und Ringen liefern eine Infektionsquelle über engen Körperkontakt und kontaminierte Matten, sodass es zu regelrechten Epidemien von Tinea capitis mit Prävalenzen von 20-50 % kam [10,29]. Unabhängig von der Sportart stellen gemeinschaftlich genutzte Dusch- und Umkleide-Räume eine weitere relevante Infektionsquelle dar.

Tabelle 2: Prävalenzen in verschiedenen Risiko-Gruppen [30]

Gruppe	Prävalenz		
	Dermatophyten	Hefen	NDM
Allgemeine Bevölkerung:	3,22 %	0,40 %	0,37 %
Kinder	0,14 %	0,09 %	-
Ältere Menschen	10,28 %	6,07 %	-
Diabetiker	8,75 %	3,97 %	1,68 %
Psoriasis	10,22 %	3,35 %	2,49 %
HIV	10,40 %	0,00 %	0,20 %
Dialyse Patienten	11,93 %	0,92 %	0,92 %
Nieren-transplantierte	5,17 %	1,72 %	-

Dabei ist die Erkrankung bei weitem nicht nur ein kosmetisches Problem. Die Läsionen sind eine Eintrittspforte für Superinfektionen. So haben Patienten mit einer Tinea pedis ein 3,2-fach erhöhtes Risiko eine bakterielle Zellulitis, typischerweise in Form eines Erysipels, zu entwickeln [31]. Auch die Exazerbation eines Diabetischen Fuß-Syndroms sowie ein negativer Einfluss auf Durchblutung und Wundheilung werden beobachtet. Es gibt auch Autoren, die eine Onychomykose als Prädiktor für die periphere arterielle Verschlusskrankheit und das Diabetische Fußsyndrom bezeichnen [17,32]. Weitere Komplikationen sind eine eingeschränkte Mobilität (bis zu 36,8 % der Patienten klagen darüber) und Schmerzen. Es kommt sogar zu Atemwegsreizungen und atopischer Dermatitis durch Pilz-Antigene [33,34]. Auch die psychosozialen Auswirkungen sind nicht zu vernachlässigen. Obwohl es sich nicht um eine letale Erkrankung handelt, kann die Lebensqualität der Betroffenen deutlich herabgesetzt sein. So geben Patienten Scham, Stigmatisierung, Depressionen und sogar Beziehungsprobleme durch die Vermeidung von Intimität an. In manchen Fällen hat die Erkrankung auch einen Einfluss auf das Berufsleben, z.B. durch Schmerzen beim Laufen oder bei befallenen Fingernägeln in Tätigkeitsfeldern mit Kundenkontakt [22,33]. Nicht zuletzt ist es auch ein gesundheitsökonomisches Problem. So wurden z.B. schon im Jahre 1996 in den USA über 400 Millionen \$ für die Therapie ausgegeben [35].

4.1.4 Virulenzfaktoren

Virulenzfaktoren sind Strukturelemente oder Stoffwechselprodukte eines Erregers, die seine krankmachende Wirkung bestimmen. Die Virulenzfaktoren von Dermatophyten sind Gegenstand aktueller Forschung. Folgende Faktoren wurden aber beschrieben:

Keratinasen zerstören das Keratin im Stratum corneum der Epidermis von Haut, Haaren und Nägeln und ermöglichen so das Eindringen der Erreger. An dieser Destruktion sind außerdem Sulfitefflux-Pumpen und Cystein-Dioxygenasen beteiligt.

Mannan Glykoproteine in der Zellwand der Pilze ermöglichen sowohl eine Adhärenz an das Epithel als auch eine Immunmodulation durch Lymphozyten-Inhibition. Letztere trägt dazu bei, dass die Infektion oft nur sehr oberflächlich ist, nicht bemerkt wird und so chronifizieren kann. Die Erreger sind oft sehr wirtsadaptiert. [17,36,37]

4.1.5 Therapie

Obwohl Dermatomykosen keine lebensbedrohlichen Erkrankungen sind, sollten sie dennoch adäquat therapiert werden. Angriffspunkt der meisten eingesetzten Antimykotika ist die Biosynthese von Ergosterol, einem essentiellen Bestandteil der Zellmembran von Pilzen. Dazu gehören die Azole (z.B. Miconazol, Ketoconazol, Itraconazol, Fluconazol), welche zwar nur fungistatisch wirken, aber eine relativ geringe Toxizität haben. Sie wirken gegen Hefen, Fadenpilze und dimorphe Pilze und es sind keine primären oder sekundären Resistenzen bekannt. Terbinafin, aus der Klasse der Allylamine, wirkt fungizid und ist sehr effektiv gegen Dermatophyten und Schimmelpilze und wird oft zur Therapie einer Onychomykose eingesetzt. Nachteile sind die häufigen Rezidive und die Hepatotoxizität, welche eine regelmäßige Kontrolle der Leberwerte während der Therapie nötig macht. Eine weitere Gruppe der Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren sind die Morpholine (Amorolfine). Sie zeichnen sich durch ein breites Spektrum aus (Hefen, Fadenpilze und einige Schimmelpilze) und werden vor allem topisch als Nagellack angewandt.

Die Wahl des Antimykotikums ist abhängig von der klinischen Erscheinungsform, dem Erreger, der zu erwartenden Compliance des Patienten sowie von den Komorbiditäten bzw. bereits verordneten Medikamenten des Patienten [16,38]. Die Therapie von Kindern stellt dabei eine besondere Herausforderung dar, da viele der Wirkstoffe nur für Erwachsene zugelassen sind. Hier kommt es oft zu einem off-label Gebrauch [39].

Gerade die Onychomykose ist schwierig zu therapieren. Oft ist eine Kombinations-therapie mit oralen und topischen Präparaten nötig. Letztere ist oft langwierig, bis zu 18 Monate, und Rezidive sind keine Seltenheit. Unterstützende Wirkung der Therapie hat die atraumatische Nagelentfernung gezeigt. Bei der Tinea capitis sollte eine Erreger-spezifische Therapie erfolgen. Terbinafin wirkt z.B. gut gegen *Trichophyton spp.*, wohingegen bei Infektionen mit *Microsporum spp.* Griseofulvin bzw. Azole (z.B. Itraconazol) das Mittel der Wahl sind.

Wichtig beim Management der Dermatomykosen sind außerdem eine geeignete Prophylaxe vor Rezidiven und Reinfektionen sowie eine Unterbrechung der Infektionskette und somit der Schutz vor Ansteckung Anderer. Dazu zählen z.B. Hygienemaßnahmen wie das Desinfizieren bzw. Austauschen von Schuhen, Matten, Fußböden und anderer potentiell kontaminierter Materialien sowie auch die Schulung der Patienten. Unter Umständen kann auch die Therapie von Haustieren und asymptomatischen Trägern nötig sein [40,41].

Ein weiteres Problem bei der Therapie ist, dass es keine einheitliche Definition gibt, wann ein Patient als geheilt gilt. Dementsprechend haben auch Studien zur Wirksamkeit von Medikamenten unterschiedliche Endpunkte. Nägel sehen oft auch noch Monate nach Heilung nicht wieder normal aus, sodass eine rein klinische Beurteilung schwer fällt. Eine sogenannte „mykologische Heilung“ liegt vor bei negativen Ergebnissen in Kultur und Mikroskopie. Allerdings kann in der Mikroskopie nicht zwischen toten und vitalen Pilzen unterschieden werden. Ghannoum et al. schlagen vor, eine Heilung wie folgt zu definieren: Die Abwesenheit von klinischen Zeichen oder das Vorliegen von negativen Kulturen, unabhängig von mikroskopischen Ergebnissen, nach einer adäquaten Auswasch-Phase nach Beendigung der Therapie [42,43].

Die Fragen nach der Therapie-Dauer, der Senkung der Rezidiv-Rate, der Definition eines Therapie-Erfolges und die Wahl des optimalen Mittels sowie seiner jeweiligen Darreichungsform sind also noch Gegenstand aktueller Forschung und Diskussionen [23].

4.2 Diagnostik

4.2.1 Herkömmliche Diagnostik

Vor Therapieeinleitung sollte der Nachweis eines Erregers vorliegen. Die Gründe für ein solches Vorgehen liegen auf der Hand: Es müssen Differentialdiagnosen wie Psoriasis, Kontaktdermatitis, Lichen planus und bakterielle Infektionen ausgeschlossen werden. Klinisch zeigt sich hier oft ein ähnliches Bild und es kommt in bis zu 50 % zu Fehldiagnosen [16,34]. Zudem ist die Wahl des Antimykotikums abhängig vom Erreger. Die z.T. monatelange Behandlung mit Medikamenten, deren Neben- bzw. Wechselwirkungen nicht zu vernachlässigen sind, sollte nicht unnötig erfolgen [40,44]. Nicht zuletzt ist auch die Kosteneffektivität einer Diagnostik vor Therapiebeginn nachgewiesen [45]. Eine verzögerte Diagnostik kann im Falle der Tinea capitis zu Vernarbungen oder unnötigen invasiven Therapien, wie z.B. Exzision von vermeintlichen Abszessen führen [46]. Dennoch wird oft auf einen Erregernachweis verzichtet: Nur 39,6 % der Dermatologen und sogar nur 3,4 % der Allgemeinmediziner veranlassen eine Diagnostik [47]. Gründe für diese niedrige Rate werden in der spezialisierten und relativ aufwendigen Diagnostik, der langen Dauer der Kultur und in mangelndem Vertrauen in die Ergebnisse gesehen [48]. Viele Autoren vermissen einen einheitlichen Standard oder Algorithmus [26,44,49]. Die deutschen Leitlinien geben zwar eine grobe Orientierung, sind aber seit langer Zeit nicht aktualisiert worden. Neue molekulare Methoden wie Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) oder Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) sind z.B. noch nicht darin enthalten [7,50].

Erste Schritte auf dem Weg zur Diagnose sind die eingehende Anamnese und eine gründliche klinische Untersuchung. Diese sind, selbst wenn sie von einem erfahrenen Dermatologen durchgeführt werden, oft sehr ungenau (s.o.). Reiseanamnese sowie Tierkontakte sollten erfragt werden. Der nächste, womöglich wichtigste Punkt ist die Probenentnahme [51], die durch geschultes Personal erfolgen sollte. Abhängig vom klinischen Bild kommen verschiedene Instrumente zum Einsatz (Skalpell, Kürette, spezielle Knipser, Abstrich-Tupfer etc.). Die Entnahmestelle sollte bei Verdacht auf Onychomykose möglichst weit proximal liegen und bei Hautläsionen im Randbereich, da dort die höchste Dichte an vitalen Pilzen zu erwarten ist. Zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen sollte eine Desinfektion des Areals mit z.B. 70 %igem

Alkohol erfolgen. Falls schon eine Vormedikation erfolgt ist, sollte eine Therapiepause von zwei bis vier Wochen vor der Probenentnahme eingehalten werden [21,50].

Die anschließende herkömmliche mykologische Diagnostik beinhaltet die Mikroskopie des Nativmaterials und die Anzucht auf Kulturmedien. Die Mikroskopie ermöglicht einen Direktnachweis der Erreger, allerdings ohne das Potenzial einer Differenzierung auf Spezies-Ebene. Zum Verdau des Keratins wird das Probenmaterial für ein bis zwei Stunden in 10-20 %iger Kaliumhydroxid (KOH)- oder 20 %iger Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH)-Lösung in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend erfolgt die Beurteilung unter dem Lichtmikroskop. Nach einem positiven Ergebnis kann bereits eine Therapie eingeleitet werden, während das Ergebnis der langwierigen Kultur abgewartet wird. Allerdings gibt es ca. 15 % falsch-negative Ergebnisse und die Sensitivität ist sehr Untersucher-abhängig [49]. Die Empfehlungen gehen daher zum Einsatz von optischen Aufhellern wie Calcofluor oder Blankophor [18]. Das Prinzip dieser ursprünglich aus der Papier- und Waschmittel-Industrie kommenden Diaminostilbene ist die Bindung an β -Glykoside, welche im menschlichen Körper nicht vorkommen. Sie sind allerdings Bestandteil der Zellwand von Pflanzen (Zellulose) und Pilzen (Chitin, Glukan). Bei Anregung durch langwelliges UV-Licht können so semi-spezifisch die Zellwände der Pilze hervorgehoben werden [52]. Zahlreiche Studien haben belegt, dass dies zu einer Verbesserung der Sensitivität um bis zu 22 % sowie zur schnelleren und leichteren Beurteilung des Nativpräparats führt [52–55]. Nachteil der Methode ist die Notwendigkeit eines Fluoreszenzmikroskops.

Die Kultur ist die zweite Säule der herkömmlichen Diagnostik. Bei der Anzucht der Erreger kommen verschiedene Medien zum Einsatz. Gängig ist die Verwendung von Kimmig- oder Sabouraud-Glukose-Agar. Meist werden Antibiotika (z.B. Chloramphenicol oder Gentamycin) zugegeben, um eine bakterielle Überwucherung zu vermeiden. Leitliniengerecht sollten immer zwei Platten beimpft werden: eine mit Zusatz von Cycloheximid, um das Wachstum von Schimmelpilzen zu verhindern, und eine ohne Zusatz, um mögliche Differenzialdiagnosen nicht zu verpassen [7,50]. Es sind auch fertige Selektivmedien mit Zusätzen kommerziell erhältlich. Die Bebrütung erfolgt über zwei bis vier Wochen bei Raumtemperatur. Allerdings sollte bei klinischem Verdacht auf *Tinea barbae* zusätzlich ein Medium bei 37°C bebrütet werden (*T. verrucosum*). Um die Austrocknung der Medien zu vermeiden, werden diese mit Klebeband am Rand abgedichtet. Es sind auch Temperaturen von 26 bis 32°C beschrieben [18].

Bei Wachstum werden zum einen makroskopische Wachstumsmuster wie Farbstoff- oder Myzelbildung beurteilt. Zum anderen sind mikroskopische Merkmale wie Makro- und Mikrokonidien relevant. Für einige Dermatophyten und Hefen stehen spezielle biochemische Differenzierungsmethoden zur Verfügung (z.B. Harnstoff-Spaltung, Haarperforations-Test, Zuckerassimilierung). Außerdem kann bei Bedarf eine Resistenz-Bestimmung durchgeführt werden. Mittlerweile gibt es auch ein „Dermatophyte test medium“ (DTM) als in-office Variante. Hier kann direkt in der Praxis eine Kultur angelegt werden und ein Nachweis von Dermatophyten zeigt sich durch einen roten Farbumschlag. Allerdings liegt die Korrelation mit der herkömmlichen Kultur nur bei 50 % und es findet keine Differenzierung statt [44].

Eine weitere, relativ selten eingesetzte, Möglichkeit des Erreger-Nachweises bietet die histologische Untersuchung von Biopsien, meist mit Periodic acid-Schiff reaction (PAS-Färbung) oder Methenaminversilberung nach Gomori (GMS) [26].

All diese Methoden haben Vor- und Nachteile und es herrscht keine einheitliche Meinung, was der Goldstandard ist. Die Mikroskopie ist schnell und günstig durchzuführen, erfordert allerdings erfahrene Untersucher und erlaubt lediglich eine Differenzierung auf Genus-Ebene. Außerdem kann keine Aussage zur Vitalität der Pilze oder Resistenzen getroffen werden. Die Kultur liefert Erkenntnisse zu Vitalität, Resistenzen, Spezies und Differenzialdiagnosen und ist noch dazu relativ günstig. Allerdings ist auch hier speziell geschultes Personal nötig. Ihr wohl größter Nachteil ist aber die Dauer von mehreren Wochen. Außerdem ist ihre Sensitivität relativ gering und in 30 bis 50 % der mikroskopisch positiven Fälle zeigt die Kultur kein Wachstum [18,56,57]. Gründe hierfür können sein: suboptimale Probenentnahme oder zu wenig Material, anbehandelte Patienten (z.T. auch durch frei verkäufliche Präparate, die nicht angegeben werden), zu kurze Inkubationszeit und Überwucherung durch kontaminierende Schimmelpilze [44]. Hinzu kommt, dass Dermatophyten sehr schwer zu differenzieren sind, da einige Spezies sehr ähnliche Merkmale aufweisen und auf der anderen Seite Isolate ein und derselben Spezies sich sehr variabel präsentieren. So kann oft keine sichere Spezies-Identifikation erfolgen [58]. Die Histologie ist sensitiv und zeigt mögliche Differenzialdiagnosen wie z.B. Lichen oder Psoriasis, kann allerdings auch keine Differenzierung bieten und ist in frühen Phasen der Infektion oft negativ. Ein weiterer Nachteil ist die Notwendigkeit einer Biopsie, einer invasiven Untersuchung, die je nach Lokalisation, auch relativ aufwendig sein kann [49].

Die Angaben zu den Gütekriterien der verschiedenen Methoden variieren sehr. Mit einer kürzlich veröffentlichten Metaanalyse versuchen Velasquez et al. einen Überblick zu schaffen. Die dort ermittelten Werte zu Sensitivität, Spezifität, Positiv Prädiktivem Wert (PPV) und Negativ Prädiktivem Wert (NPV) sind mit ihren 95 % Konfidenzintervallen in Tabelle 3 dargestellt [59].

Tabelle 3: Gütekriterien der Methoden nach Velasquez et al. [59]

Methode	KOH	Kultur	Biopsie
Sensitivität	61,0 % (95 % CI = 59-64 %)	56,0 % (95 % CI = 54-59 %)	84,0 % (95 % CI = 82-86 %)
Spezifität	95,0 % (95 % CI = 94-97 %)	99,0 % (95 % CI = 98-100 %)	89,0 % (95 % CI = 87-91 %)
PPV	96,3 % (95 % CI = 96,2-96,4 %)	99,4 % (95 % CI = 99,3-99,5 %)	93,4 % (95 % CI = 93,3-93,5 %)
NPV	55,9 % (95 % CI = 55,8-56,0 %)	52,0 % (95 % CI = 51,9-52,1 %)	75,4 % (95 % CI = 75,3-75,5 %)

Bislang gibt es keine einheitlichen Empfehlungen für die Diagnostik und es gibt viele verschiedene Meinungen über die Qualität der einzelnen Methoden. Keine Methode ist perfekt. Aus diesen Gründen sind die Bemühungen, die Diagnostik mit neuen Methoden zu ergänzen und zu optimieren, sehr groß. Die Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) hat in der Mikrobiologie in den letzten Jahren immer breitere Verwendung gefunden. So gibt es auch Bestrebungen diese in der Pilz-Diagnostik einzusetzen. Prinzip dieser Methode ist es, den charakteristischen „Protein-Fingerabdruck“ eines Mikroorganismus‘ anhand einer Referenzspektrum-Bibliothek von Spezies-spezifischen Proteinmustern zu identifizieren. Eine Übereinstimmung mit der herkömmlichen Diagnostik konnte in 78,2 % erreicht werden, mit der PCR sogar in 99,3 %. Diese Methode kann oft eine Spezies-Bestimmung machen, wo die Kultur kein eindeutiges Ergebnis liefert. Allerdings ist bislang noch eine vorherige Anzucht nötig. Versuche, die Methode an Direktmaterial anzuwenden, stecken noch in den Kinderschuhen. Weitere Nachteile sind hohe Anschaffungskosten und die Notwendigkeit einer speziellen Schulung des Personals. Außerdem sind die momentan verfügbaren Referenz-Bibliotheken der Hersteller noch lückenhaft, was Dermatophyten angeht. Viele Labore etablieren daher eigene Datenbanken, was wiederum aufwändig und fehleranfällig ist und eine große Expertise voraussetzt [60–62].

Eine andere interessante Entwicklung ist auch der Ansatz eines Immunchromatographie-Streifentests (ICG). Dieser weist mittels eines monoklonalen Antikörpers haupt-

sächlich *Trichophyton spp.* nach. Einsatzmöglichkeiten wären als Screening-Test denkbar oder als „over-the-counter“ Test, sodass die oft von Schamgefühl geplagten Patienten sich zuhause selbst testen können [63,64].

4.2.2 Molekulare Diagnostik

Die wohl vielversprechendste Wendung bezüglich der Dermatophyten-Diagnostik ist die Entwicklung molekularer Methoden. Im Zuge der allgemeinen Entwicklung in der diagnostischen Mikrobiologie werden molekulare Methoden immer weiter an Stellenwert gewinnen und sind zumindest als Ergänzung zu herkömmlichen Methoden nicht mehr wegzudenken [26]. Die Meinungen gehen jedoch weit auseinander, ob die PCR lediglich als komplementäre Methode zu sehen ist [58] oder ob sie die herkömmliche Diagnostik über kurz oder lang komplett ersetzen wird [26,65].

In den letzten Jahren wurden viele verschiedene Methoden publiziert und einige sind mittlerweile auch kommerziell erhältlich. Dabei unterscheiden sich die Tests in mehreren Aspekten: Zum einen werden verschiedene Zielstrukturen (targets) verwendet, wie u.a. das Topoisomerase II-Gen, verschiedene Internal Transcribed Spacer (ITS) Regionen der rDNA, das *Chitinase*-Gen, die 28 S-rDNA und Mikrosatellitenmarker. Außerdem gibt es Unterschiede in der Detektion der Ergebnisse nach abgelaufener PCR. Es kommen ELISAs (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), Agarose-Gele und Real-time PCR zum Einsatz [18,58]. Die PCR bietet dabei entscheidende Vorteile: Sie ist sehr sensitiv (z.T. > 90 % [49]) und erfasst auch nicht-vitale Pilze, ist also auch unter laufender Therapie möglich. Eines der wichtigsten Argumente für die PCR ist wohl ihre schnelle Durchführbarkeit. Die meisten Tests können aus Direktmaterial gemacht werden und liefern innerhalb von 24 bis 48 Stunden ein Ergebnis, sodass die wochenlange Anzucht mittels einer Kultur grundsätzlich entfallen könnte. Es ist zumindest bei einigen Methoden eine Identifikation der Erreger auf Spezies-Ebene möglich. Hier nachgewiesene NDM sind eher als Erreger anzusehen als in der Kultur, wo es oft zu Kontaminationen der Nährmedien kommt [66].

Die immer weiter verbreitete Sequenzierung von Pilzen hat auch zu Reformen in der Taxonomie geführt. Einige Erreger können sogar nur mit molekularen Methoden voneinander abgegrenzt werden. Außerdem sind durch Analysen auf Stammes-Ebene aufschlussreiche Erkenntnisse in der Epidemiologie und über Infektionswege

möglich [26,67,68].

Nachteile der molekularen Methoden sind hohe Kosten für die nötige Ausstattung und dass auch hier speziell geschultes Personal nötig ist. Diese Aspekte relativieren sich, wenn ähnliche Methoden schon für andere Erreger-Nachweise in einem Labor etabliert sind. Bei vielen Methoden ist aber auch hier nur eine Differenzierung auf Genus-Ebene vorgesehen [18,49].

Im Folgenden sollen einige Aspekte der molekularen Diagnostik genauer erläutert werden.

4.2.2.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA gibt es verschiedenste Methoden. Sowohl maschinelle als auch manuelle Aufreinigungen haben ihren Platz in der Routine. Die hier verwendete DNA-Isolierung mit dem NucliSENS® EasyMAG® (Biomerieux) nutzt die Eigenschaft von Kieselgel, in Gegenwart von chaotrophen Guanidinium-Thiocyanat Nukleinsäuren zu binden ^[69]. Diese Methode ist schnell und hat eine relativ geringe Hands-on time (Zeit, in der manuelle Arbeiten ausgeführt werden müssen und somit Personal gebunden ist) .

Eine weitere fest etablierte Methode ist die Aufreinigung mit dem MagNA Pure der Firma Roche. Auch hier wird die Nukleinsäure von Kieselgel gebunden und nach mehreren Waschschritten wieder eluiert.

4.2.2.2 PCR

Die Erfindung der Polymerase-Ketten-Reaktion, kurz PCR (nach dem englischen Ausdruck polymerase chain reaction), revolutionierte die Biowissenschaften. Sie ist heutzutage aus vielen Bereichen nicht mehr wegzudenken. 1971 publizierte der Nobelpreisträger Har Gobind Khorana das Prinzip einer wiederholten DNA-Polymerisation mit dem gleichzeitigen Einsatz von zwei Primern. Der Amerikaner Kary Mullis modifizierte diese Methode 1985 insofern, als dass er zwei verschiedene Startpunkte für die DNA-Synthese festlegte. Hiermit wurde DNA erstmals amplifiziert, also vervielfältigt. Bei seiner Variante, für die er 1993 den Nobelpreis für Chemie bekam, entsteht durch die zwei verschiedenen Primer ein begrenzter DNA-Abschnitt, der amplifiziert wird. Die Primer werden so gewählt, dass die Synthese-Reaktionen aufeinander

zulaufen [70].

Für jede PCR sind einige Komponenten zwingend erforderlich:

- Die DNA-Polymerase katalysiert die Synthese. Mittlerweile wird sie oft aus thermophilen Bakterien gewonnen wie z.B. *Thermus aquaticus*, die sogenannte Taq-Polymerase. Sie ist auch noch bei Temperaturen bis zu 97°C stabil. Dies hat den Vorteil, dass nicht nach jedem Zyklus neue Polymerase zugegeben werden muss.
- Desoxynukleosidtriphosphate als die vier Bausteine der DNA müssen im Ansatz enthalten sein. Gemischt werden dATP, dCTP, dGTP und dTTP, auch als dNTP's bezeichnet.
- Die Polymerase setzt als Substrat Mg^{2+} /dNTP-Komplexe um. Neben geeigneten Puffer- und Salzbedingungen müssen auch genug Magnesium (Mg^{2+})-Ionen vorhanden sein.
- Des Weiteren muss ein einzelsträngiger DNA-Abschnitt vorliegen, der kopiert werden soll. Da diese Matrize, auch Template genannt, allerdings bei der PCR doppelsträngig vorliegt, wird eine Denaturierung durch Erhitzen erforderlich.
- Die Primer sind kurze Oligonukleotide und bilden durch Hybridisieren an das einzelsträngige Template einen kurzen doppelsträngigen Bereich. Dieser stellt den Startpunkt der DNA-Synthese dar. Daraus ergibt sich, dass nur Abschnitte zwischen bekannten Nukleotidsequenzen amplifiziert werden können. Für diese Bereiche werden spezifische Primer synthetisiert. Der so eingeschlossene Bereich muss allerdings nicht bekannt sein.

Prinzip der PCR:

Alle Komponenten der PCR werden also gemischt und in einen sogenannten Thermocycler gegeben. Dort laufen bestimmte Programmabfolgen mit unterschiedlichen Temperaturniveaus ab.

In der ersten Phase, auch Denaturierung genannt, wird in ca. 5 Minuten bei 95°C die doppelsträngige DNA erhitzt. Dadurch erhält man einzelsträngige DNA.

Die darauffolgende Annealing-Phase findet bei 50-60°C statt. Hier verbinden sich die Primer mit den komplementären Bereichen auf den Templates zu einem Hybrid. Dabei

sollten die Primer im Überschuss vorliegen. Dieser Prozess läuft schnell ab und benötigt meist nur 30 Sekunden.

Die letzte Phase wird als Elongation bezeichnet. Bei einem Temperaturoptimum von 72°C verlängern die Polymerasen jetzt die DNA-Abschnitte. Dies kann je nach Länge des Bereiches bis zu mehreren Minuten dauern.

Diese 3 Phasen werden als ein Zyklus zusammengefasst (Abbildung 1). Nach der letzten Phase beginnt ein neuer Zyklus, wieder mit der Denaturierung. Je nachdem, wie viel PCR-Produkt gewünscht ist, können 25 bis 50 solcher Zyklen durchgeführt werden.

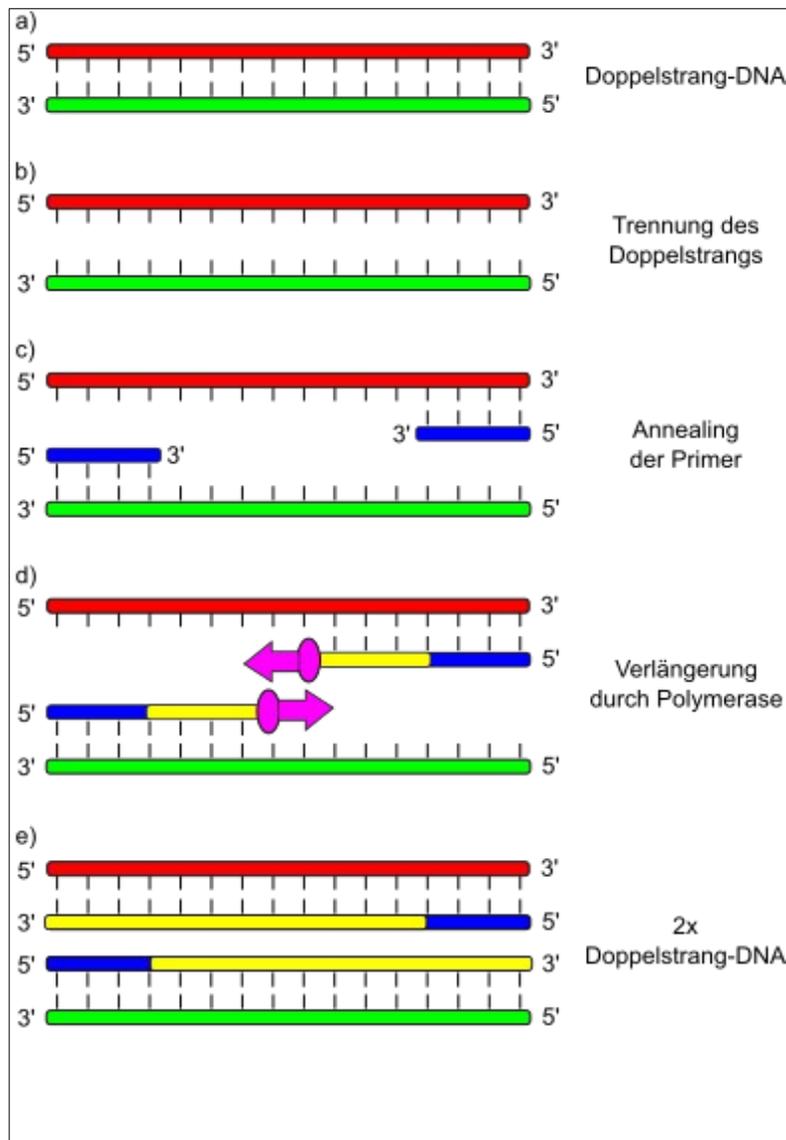


Abbildung 1: Übersicht PCR Zyklus

Zunächst erfolgt die Trennung des Doppelstrangs (a,b). Im nächsten Schritt verbinden sich die Primer mit den komplementären Bereichen (c). Nun verlängern die Polymerasen die DNA-Abschnitte (d). Am Ende hat man so zwei Doppelstränge (e).

4.2.2.3 Real-time PCR

Nach der PCR muss die vervielfältigte DNA dann noch sichtbar gemacht werden, was als Detektion bezeichnet wird. Bei der konventionellen PCR geschieht dies meist mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die DNA wird dabei mit Ethidiumbromid angefärbt und kann unter UV-Licht beurteilt werden.

Bei der Real-time PCR kann mittels Fluoreszenzfarbstoffen, die spezifisch an doppelsträngige DNA binden, die Amplifikation in Echtzeit nachvollzogen werden. Da das

Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt, ist dabei auch eine Quantifizierung der DNA möglich, weshalb die Methode auch Quantitative PCR genannt wird. Andere Vorteile sind, dass der Umgang mit gesundheitsschädlichen Substanzen wie Ethidiumbromid vermieden wird. Außerdem finden Amplifikation und Detektion im selben Gefäß statt, sodass Arbeitsschritte nach der eigentlichen PCR entfallen und das Gefäß nicht wieder geöffnet werden muss. Dies macht die Methode erstens schneller und zweitens ist das Risiko für Kontaminationen deutlich geringer [58,65,70].

Der LightCycler® (Roche) ermöglicht ein gleichzeitiges Stattfinden von Amplifikation und Hybridisierung. Ein schematischer Aufbau ist in Abbildung 2 zu sehen. Dabei werden unter anderem Hybridization Probes eingesetzt (kurz HybProbes oder auch Sonden genannt). Bei diesem, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) genannten Prinzip, werden zwei Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide genutzt (s. auch Abbildung 3): Ein Donor ist am 3'-Ende mit Fluorescein markiert, welches vom blauen Licht des LightCyclers® angeregt wird. Ein benachbarter Akzeptor absorbiert die Resonanz-Energie des Donors. Dieser Transfer findet allerdings nur statt, wenn Donor und Akzeptor in der Annealing-Phase an das PCR-Produkt gebunden sind. Das bedeutet, dass das Fluoreszenz-Signal ein direktes Ergebnis der Hybridisierung ist, was die Methode hoch spezifisch macht [71]. Es gibt verschiedene Farbstoffe, die mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden. Dies ermöglicht mit nur einem Ansatz einen simultanen Nachweis mehrerer Erreger.

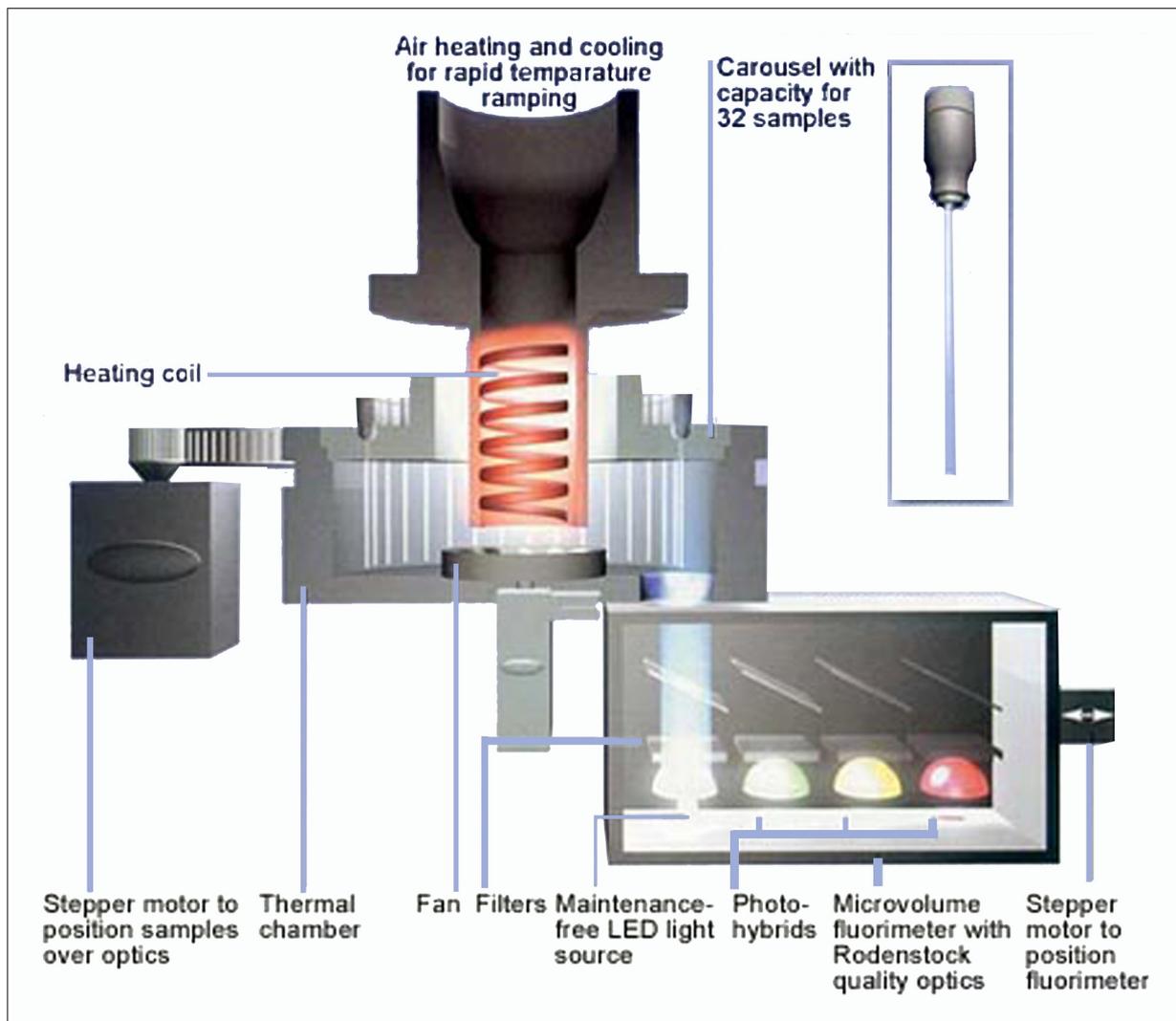


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines LightCycler® (Roche) [82]

Im LightCycler® können Amplifikation und Hybridisierung gleichzeitig stattfinden. Die Proben sind mit dem Master-Mix zusammen in den Glaskapillaren. Durch die Heizeinheit können die für die PCR nötigen Temperaturen in der Kammer erreicht werden. Nach jedem Zyklus wird das Karussell so gedreht, dass jede Kapillare über dem Fluorimeter hält. Dabei erfolgt die Anregung durch das blaue Licht und es kann direkt danach das so entstandene das Fluoreszenzsignal abgelesen werden.

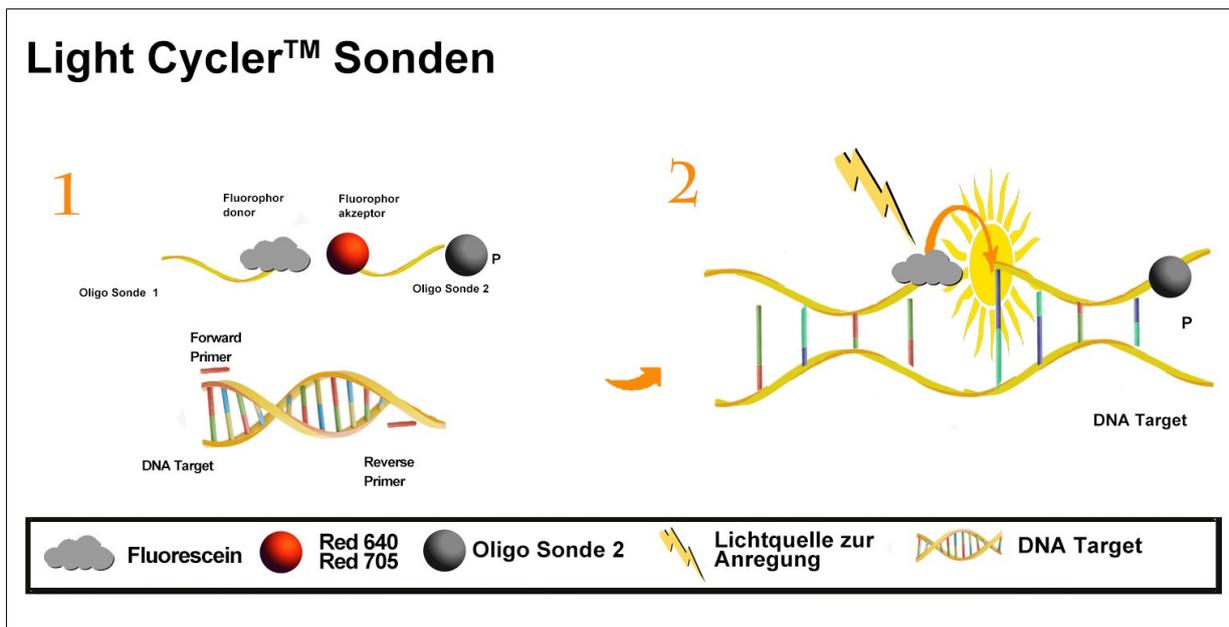


Abbildung 3: Funktionsprinzip der Hybridisierungssonden

Während jedem Amplifikationszyklus verbinden sich die beiden Primer und Sonden mit dem DNA Target (1). Die Anregung des Donors durch eine externe Lichtquelle führt zur Emission von Fluoreszenz durch Energie-Transfer (2).

Ein weiteres Prinzip der Detektion von PCR-Produkten ist der Nachweis auf Streifen mittels Hybridisierungssonden. Dabei sind auf den Streifen spezifische Oligonukleotide angebracht. Kommen jetzt die komplementären PCR-Amplifikate hinzu, hybridisieren diese und es kommt zu einer farbigen Bande auf dem Streifen.

5 Zielsetzung

5.1 Ziele dieser Arbeit

Dermatomykosen sind ein weltweit verbreitetes Krankheitsbild mit steigender Prävalenz. Die herkömmliche Diagnostik mittels direkter Mikroskopie und Kultur hat viele Nachteile und es bedarf daher einer Optimierung. In den letzten Jahren sind viele molekulare Methoden auf PCR-Basis publiziert worden und einige sogar kommerziell erhältlich. Diese unterscheiden sich gravierend in Punkten wie Kosten, notwendiger technischer Ausstattung, Hands-on time etc. Die Entscheidung, welche Methode für ein bestimmtes Labor geeignet ist, fällt also oft schwer. Bisher wird die PCR noch nicht in vielen Laboren in der Routine für die Dermatophyten-Diagnostik eingesetzt. Verrier et al. fordern von diesen „Pionieren“ ihre Erfahrungen zu teilen, um anderen bei der Entscheidungsfindung zu helfen [58].

Ziel dieser Arbeit war es deshalb eine In-house Methode (nach Bergmans et al. [72]) und zwei kommerziell erhältliche Kits (FTD Dermatophytes von Fast Track Diagnostics und Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow von Biotype Diagnostic GmbH) sowohl untereinander als auch mit den klassischen Methoden zu vergleichen. Kriterien waren hierbei Sensitivität und Spezifität aber auch Kosten und Praktikabilität.

5.2 Auswahl der Methoden

Die drei Methoden unterscheiden sich in Detektionsformat, Erreger-Spektrum und benötigter technischer Ausstattung.

Die In-house Methode (nach Bergmans et al. [72]) ist eine Real-time PCR, welche als Target ITS1 Regionen nutzt. Die Detektion erfolgt dabei auf dem LightCycler® 2.0 (Roche) mittels Hybridization Probes und einer Schmelzkurvenanalyse. Es können elf Spezies aus den drei Dermatophyten-Arten Trichophyton, Microsporum und Epidermophyton detektiert und identifiziert werden.

Einer der kommerziell erhältlichen Tests ist das FTD Dermatophyte Kit von Fast Track Diagnostics, auch eine Real-time PCR. Hier kommt zur gleichzeitigen Amplifikation und Detektion der LightCycler® 480 (Roche) zum Einsatz, an dem ein Cycle threshold value (Ct) ermittelt wird. Es werden 20 verschiedene Spezies, zusammengefasst in

fünf Komplexen, nachgewiesen. Das Kit war zum Zeitpunkt der Testung CE und IVD zertifiziert. Mittlerweile hat FTD fast sein ganzes Sortiment zurückgerufen und auch die Zertifizierung besteht nicht mehr.

Die dritte Methode ist das Kit Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow von Biotype Diagnostic GmbH. Hier erfolgt die Amplifikation an einem gewöhnlichen Thermocycler und die Detektion über Lateral Flow Streifen. Besonderheit hier ist die Stufendiagnostik: In einer ersten Multiplex-PCR können *Trichophyton rubrum*, *Candida spp.* und *Scopulariopsis brevicaulis* sowie undifferenziert andere Dermatophyten nachgewiesen werden. Es sind also auch die klinisch relevantesten Hefen und Schimmelpilze mit abgedeckt. In zwei weiteren PCR können die weiteren Dermatophyten näher bestimmt werden. Dieser Test ist CE und IVD zertifiziert.

Da bisher sehr wenige Methoden extern mit klinischen Proben validiert worden sind, werden Forderungen nach unvoreingenommenen Untersuchungen laut [65]. Nach unserem jetzigen Kenntnisstand sind bereits Studien mit dem Kit von Biotype Diagnostic publiziert worden, jedoch noch keine mit dem Kit von FTD [48,73]. Die In-house Methode (nach Bergmans et al.) wird als herausragend interessante und umfangreichste Methode beschrieben [65].

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Hersteller
NucliSENS® EasyMAG®	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
LightCycler® 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler® 480	Roche Diagnostics, Mannheim
Plattenzentrifuge 4-15C	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode
LC Carousel Centrifuge 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
LC Sample Carousel 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
Tischzentrifuge	VWR, Darmstadt
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Kendro, Hanau
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Gilson, Limburg
Thermocycler 2720	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermocycler Primus 25	Hain Lifescience, Nehren
Mikroskop Axiolab	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Kühlblock	Roche Diagnostics, Mannheim

6.1.2 Software

Tabelle 5: Software

Programm	Hersteller
LightCycler® Software 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler® Software 480	Roche Diagnostics, Mannheim
LibreOffice (calc, draw,...)	Open Source (The Document Foundation, Berlin)
Sofastats	Open Source (Paton-Simpson & Associates Ltd)
Inkscape	Open Source (Free Software Foundation, Inc., Boston, USA)

GIMP	Open Source (GIMP Team)
MedCalc	MedCalc Software, Ostend, Belgien

6.1.3 Reagenzien

Tabelle 6: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
MagNA Pure Tissue Lysis Buffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
FTD Dermatophytes	Fast Track Diagnostics, Luxemburg
Mentype® MycoDermQS Lateral Flow	Biotype Diagnostic GmbH, Dresden
LightCycler® Fast Start DNA Master HybProbes	Roche Diagnostics, Mannheim
Primer	Metabion, Planegg/Steinkirchen
Sonden	Metabion, Planegg/Steinkirchen
Calcofluor	Sigma-Aldrich, Steinheim
KOH 20 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung 10 % (TMAH)	Merck KGaA, Darmstadt
Lactophenolbalu-Lösung	VWR, Darmstadt
EasyMAG® Extraction Buffer 1	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
EasyMAG® Extraction Buffer 2	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
EasyMAG® Extraction Buffer 3	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
EasyMAG® Lysis Buffer	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
EasyMAG® Magnetic Silica	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
AgPath-ID™ One Step RT-PCR Kit	Ambion, Austin, USA
Dermasel Agarplatten	Oxoid, Basingstoke, UK

6.1.4 Datenbanken

Tabelle 7: Datenbanken

Datenbank	Internet-Adresse
PubMed Medline	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

6.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
LightCycler® Capillaries (20µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
96 Well LightCycler® Platte	Sarstedt, Nümbrecht
Adhäsive qPCR Folie	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips, diverse Größen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Starlab International GmbH, Hamburg
EasyMAG® Disposables	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Biohit Pipetten Spitzen	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Deckgläschen	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen

6.1.6 Proben

Insgesamt wurden 323 klinische Proben getestet. Eingeschlossen wurden Proben, die zur regulären Diagnostik bei Zeichen einer Dermatomykose eingeschickt wurden. Ausgeschlossen wurden Proben, bei denen zu wenig Material für die PCR übrig war oder bei denen nicht alle Ergebnisse der herkömmlichen Diagnostik vorlagen, sowie suboptimale Proben, einschließlich Abstriche. Unter den eingeschlossenen Proben befanden sich 313 Nagel-Proben, 5 Hautschuppen, 3 Haar-Proben und 2 Schuppen-Proben. Der Ablauf der Diagnostik ist in Abbildung 4 dargestellt.

Darüber hinaus wurden sieben Ringversuchsproben mit den drei PCR-Methoden getestet. Ringversuche (RV) müssen in bestimmten Abständen von jedem diagnostischen Labor als eine Maßnahme der Qualitätssicherung durchgeführt werden. Versandt werden die Proben von INSTAND e.V.. Diese Proben sind in der Regel sehr gut charakterisiert und standardisiert. In dieser Arbeit fungierten sie vor allem zu Beginn als eine Art Positivkontrolle.

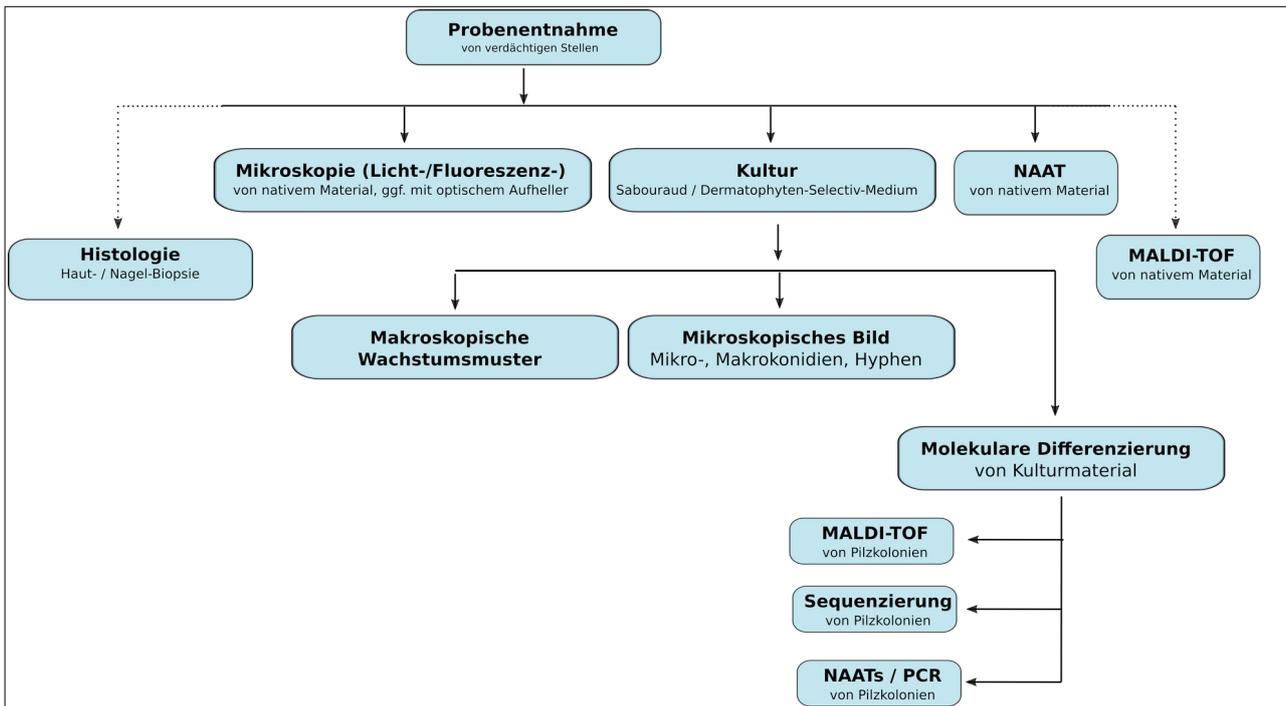


Abbildung 4: Diagnostischer Algorithmus

Der typische diagnostische Algorithmus im Labor beginnt mit der Probenentnahme. Ein Teil der Proben wird dann für die Mikroskopie vorbereitet. Ein anderer Teil wird zur kulturellen Anzucht auf Nährmedien gebracht. Falls im Labor verfügbar können auch Teile des Materials nach entsprechender Vorbereitung für eine PCR aufgereinigt werden. Selten wird Material für eine Histologie verwendet oder zum direkten Nachweis mittels MALDI-TOF. Im Falle von Wachstum auf den Kulturmedien werden makroskopische Wachstumsmuster und mikroskopische Merkmale beurteilt. Mit den gewachsenen Pilzkolonien können molekulare Differenzierungsmöglichkeiten wie PCR, MALDI-TOF oder Sequenzierung angeschlossen werden.

6.2 Methoden

6.2.1 Konventionelle Diagnostik

a) Probenentnahme (falls im Labor geschehen):

Vor Gewinnung des Untersuchungsmaterials wurde die Stelle mit 70 %igem Alkohol desinfiziert, um die bakterielle Begleitflora zu minimieren. Bei der Entnahme der verschiedenen Materialien wurde auf Folgendes geachtet:

Haare wurden mit der Wurzel entnommen.

Hautschuppen wurden am Randbereich des Herdes entnommen, weil dort die aktiven Erreger sind.

Nägel sind entweder in Stücken entnommen worden oder es wurden Späne abgefeilt. Auch hier befinden sich die lebenden Pilze an der Grenze zwischen gesundem und mykotisch verändertem Nagel. Daher wurde darauf geachtet, Material aus diesem Bereich zu gewinnen.

b) Nativpräparat:

Im Labor gab es unterschiedliche Methoden für die direkte Mikroskopie: Das Untersuchungsmaterial wurde auf einen Objektträger gebracht und mit 10 %iger KOH- oder TMAH-Lösung für mindestens 15 Minuten inkubiert und dann unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Z.T. wurden die Proben zusätzlich mit einem optischen Aufheller gefärbt. Dafür wurden 10 µl Calcofluor zu einem Tropfen der lysierten Probe gegeben und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert, bevor die Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop erfolgte.

c) Kultur:

Die Proben wurden zerkleinert und in Sabouraud-Agar bzw. Dermatophyten-selektive Medien gedrückt. Dann folgte die Bebrütung bei 28 bis 30°C für zwei bis vier Wochen. Die Kulturen wurden makroskopisch auf Wachstum kontrolliert. Bei Wachstum erfolgte die makroskopische Beurteilung und mikroskopische Differenzierung.

6.2.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung und die anschließende molekularbiologische Untersuchung wurde im MVZ Clotten, Freiburg, durchgeführt. Die DNA aus dem Direktmaterial wurde mit dem NucliSENS® EasyMAG® (Biomérieux, Nürtingen) isoliert. Vorbereitend fand ein Verdau mit 200 µl TissueLysis Buffer (Roche) und 15 µl Proteinase K bei Raumtemperatur über Nacht statt. Drei Stunden vor der Aufreinigung wurden weitere 10 µl Proteinase K hinzugefügt. Die Isolierung mit dem NucliSENS® EasyMAG® erfolgte dann nach den Angaben des Herstellers bei einem Probenvolumen von 200 µl und einem Elutionsvolumen von 55 µl.

6.2.3 PCR

6.2.3.1 In-house Methode nach Bergmans et al.

Diese Methode wurde leicht modifiziert aus der Publikation von Bergmans et al. übernommen. Die Sequenzen der Primer und HybProbes sind in Tabelle 9 dargestellt. Primer und HybProbes wurden vom Hersteller in PCR-geeignetem Wasser gelöst mit einer Konzentration von 100 µM geliefert. Es wurden adäquate Gebrauchslösungen hergestellt. Für die Interne Kontrolle (IC) wurde das Plasmid pBluescript SK mit den unten dargestellten Primern und HybProbes verwendet. Der Schmelzpunkt lag bei 59,00 – 61,00 °C.

Die Konzentrationen und der Mix-Ansatz können der Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 9: Primer Bergmans et al.

Name	Sequenz	Label
Primer		
DERMF3	GGTBTGC CTC GGC GGG CC	-
B-DERMR2	CGG AAT TCT GCA ATT CAC ATT ACT	-
Hybridisation Probe		
Mcaau 1 S	ACG CCT GAG GGG GAC TCT TG	5'-LC610
Mcauu 1 A	CTG TGC TAC ACG GGC CGT TCG GGG	3'-FL
Truvi 1 S	GCC GGA GGA CAG ACA CCA AGA AAA	5'-LC640
Truvi 1 A	CCT CGA GCC GGA CCG CGC C	3'-FL
Tveerco 1 S	GAG GAC AGA CAT CAA AAA ATC TTG AAG A	5'-LC640
Tveerco 1 A	GGG CTT TAG CTG GAT CGC GCC	3'-FL
Tinmeto 3 A	CCC GCC GGA GGA CAG ACG C	5'-LC670
Tinmeto 1 S	TAG TGG CTA AAC GCT GGA CCG	3'-FL
Efl 3 S	CTA CGA AAT CTC CAT AGG TGG TTC AGT CT	5'-LC705
Efl 1 A	GCG CTC GAA GGA GTG ATT CTC AGA AA	3'-FL
Interne Kontrolle		
Primer		
pSK-M13	GTA AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT	-
pSK-Rev	GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC	-
Hybridisation Probe		
Sk-Se	GGG CTG CAG GAA TTC GAT AT	Fluo-3'
Sk-An	AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC	5'-LCRed-705, Pho-3'

Tabelle 10: PCR Master Mix

Reaktionen	1x
LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes	4 µl
Primer DERMF3 (4 µM)	2 µl
Primer DERMR2 (13,33 µM)	2 µl
LC Hybridization probes (13,33 µM)	je 0,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
Primer IC M13/Rev	je 0,5 µl
Sonden IC Sk-AN/Sk-SE	je 0,5 µl
H ₂ O	4 µl
Total	20 µl

Endkonzentrationen:
 DERMF3 400 nM, DERMR2 1333 nM, Sonden je 333 nM
 M13/Rev 0,2 µM, SK-Se/SK-An 0,1 µM
 MgCl₂ 1,3 mM

PCR Ansatz:

Es wurden 20 µl PCR Master Mix mit 4 µl extrahierter Probe bzw. Kontrolle und 1 µl IC 10E-6 gemischt.

Die PCR in Glaskapillaren auf dem LightCycler® 2.0 geschah nach folgendem Protokoll (Tabelle 11):

Tabelle 11: PCR Protokoll Bergmans et al.

Programm	Cycles	Analysis Mode	Target Temperature	Incubation time	Temperature Transition Rate	Acquisition Mode
Denaturatio n	1	None	95°C	10 min	20,0°C/s	None
Amplifikatio n	50	Quanti- fication	95°C 55°C 72°C	20 sec 20 sec 20 sec	20,0°C/s 20,0°C/s 20,0°C/s	None Single None
Schmelz- kurve	1	Melting Curve	95°C 50°C 85°C	1 min 1 min -	20,0°C/s 20,0°C/s 0,1°C/s	None None Cont
Kühlen	1	None	40°C	30 sec	20,0°C/s	None

Die Auswertung erfolgte mittels Schmelzkurvenanalyse in vier verschiedenen

Kanälen, wobei in einem die IC detektiert wurde. Ein typischer Kurvenverlauf ist in Abbildung 5 zu sehen. Durch definierte Schmelzpunkte konnte eine Differenzierung auf Spezies-Ebene erfolgen.

6.2.3.2 FTD Dermatophytes (Fast Track Diagnostics)

Die PCR wurde gemäß den Angaben des Herstellers mit einem LightCycler® 480 (Roche) durchgeführt. Pro benötigter Reaktion wurden 1,5 µl DERM1-Primer-Mix, 12,5 µl Puffer und 1 µl Enzym für den Master Mix zusammen gegeben. Ebenso wurde mit dem DERM2-Primer Mix verfahren. Dann wurden in eine 96 Well LightCycler® Platte in einer Reihe 15 µl Master Mix DERM1 vorgelegt und in die darunter 15 µl Master Mix DERM2. Nun wurden jeweils 10 µl der Eluate von Proben bzw. Kontrollen hinzugefügt. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und kurz zentrifugiert. Dann erfolgte die PCR im LightCycler® 480 nach Protokoll des Herstellers.

Da zur Auswertung bei jeder Probe insgesamt sechs verschiedene Kanäle an zwei verschiedenen Positionen beachtet werden mussten, wurde zur leichteren Auswertung eine Tabelle entworfen (s. Tabelle 12). In den Reaktionen mit Master Mix DERM1 (Mix) waren es vier Kanäle, in denen mit Master Mix DERM2 (Mix B) waren es zwei. Es gab vier verschiedene Positivkontrollen und eine Negativkontrolle. Außerdem wurde in einem Kanal die IC nachgewiesen. Welche Erreger in welchem Kanal nachgewiesen werden konnten, ist in den farbigen Kästen unter Tabelle 12 zu sehen.

Typische Verläufe der Schmelz- bzw. Amplifikationskurven der beiden Real-time PCR-Methoden sind in Abbildung 5 zu sehen.

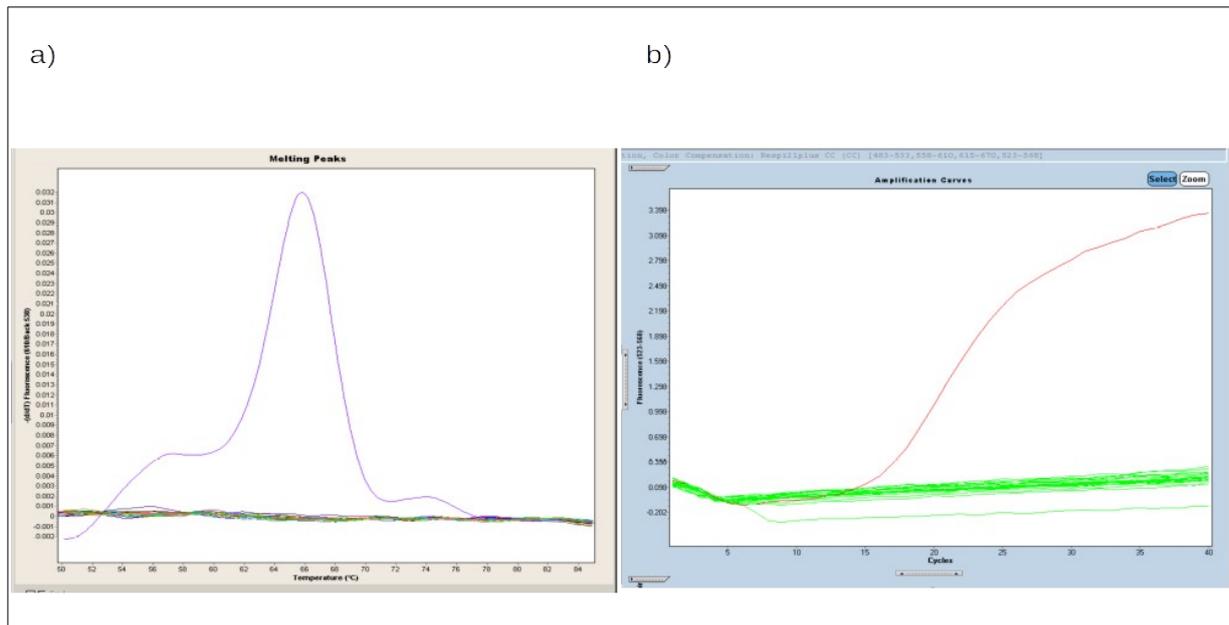


Abbildung 5: Typische Kurvenverläufe der Real-time PCR-Methoden

a) Typische Schmelzkurve der In-house Methode nach Bergmans et al.

b) Typische Amplifikationskurve bei FTD Dermatophytes

Tabelle 12: Auswertungstabelle FTD Dermatophyten

	Probe	Mix	483-533 nm	523-568 nm	558-610 nm	615-670 nm	Bewertung
1		A			IC:		
		B					
2		A			IC:		
		B					
3		A			IC:		
		B					
4		A			IC:		
		B					
5		A			IC:		
		B					
6		A			IC:		
		B					
7		A			IC:		
		B					
8		A			IC:		
		B					
9		A			IC:		
		B					
10		A			IC:		
		B					
11		A			IC:		
		B					
12	PC 1	A					<i>T. mentagrophytes-Komplex, T. tonsurans</i>
	PC 3	B					<i>M. canis, M. audouinii</i>
13	PC 2	A					<i>T. violaceum</i>
	PC 4	B					<i>T. rubrum-Komplex</i>
14	NC	A			IC:		-
		B					

Mix A:

483-533 nm: *T. mentagrophytes-Komplex:* *T. mentagrophytes*,
T. terrestris, *T. verrucosum*, *T. concentricum*, *T. interdigitale*, *T. erinacei*, *T. tonsurans*, *T. schoenleii*

523-568 nm: *T. violaceum*

558-610 nm: *T. tonsurans*; *T. equinum*

615-670 nm: IC

Mix B:

523-568 nm: *M. canis*, *M. audouinii*, *M. ferrugineum*

615-670 nm: *T. rubrum-Komplex:*

T. rubrum, *T. violaceum*, *T. fischeri*, *T. kanei*, *T. raubitschekii*, *T. soudanense*, *T. gourvilii*, *T. megninii*

6.2.3.3 Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow (Biotype Diagnostic GmbH)

Die PCR wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für den Master Mix wurden 17,5 µl Nuklease-freies Wasser, 5 µl ReactionMix A, 1 µl des spezifischen Primer Mix für PCR 1, 2 oder 3 und 0,5 µl Multi Taq2 DNA-Polymerase zusammen

gegeben. Dann wurden in einem Reaktionsgefäß je 24 µl Master Mix und 1 µl aufgereinigte Proben bzw. Kontrollen zusammen gemischt und auf einem Thermocycler (Applied Biosystems oder Hain Lifescience) die PCR durchgeführt. Parallel erfolgte die Aktivierung der LF Hybrid Mixe. Für die Hybridisierung wurde in jedes Reaktionsgefäß nach der PCR 1 µl aktivierter Hybrid Mix gegeben. Anschließend wurden in ein frisches Reaktionsgefäß 10 µl Hybridisierungsansatz zu 100 µl Laufpuffer pipettiert und dann ein LF-Teststreifen hineingestellt. Nach 25 Minuten erfolgte die Auswertung von Proben und Kontrollen mit den vorgesehenen Auswertungsschablonen. Beispiele für die fertigen Streifen sind in Abbildung 6 zu sehen.

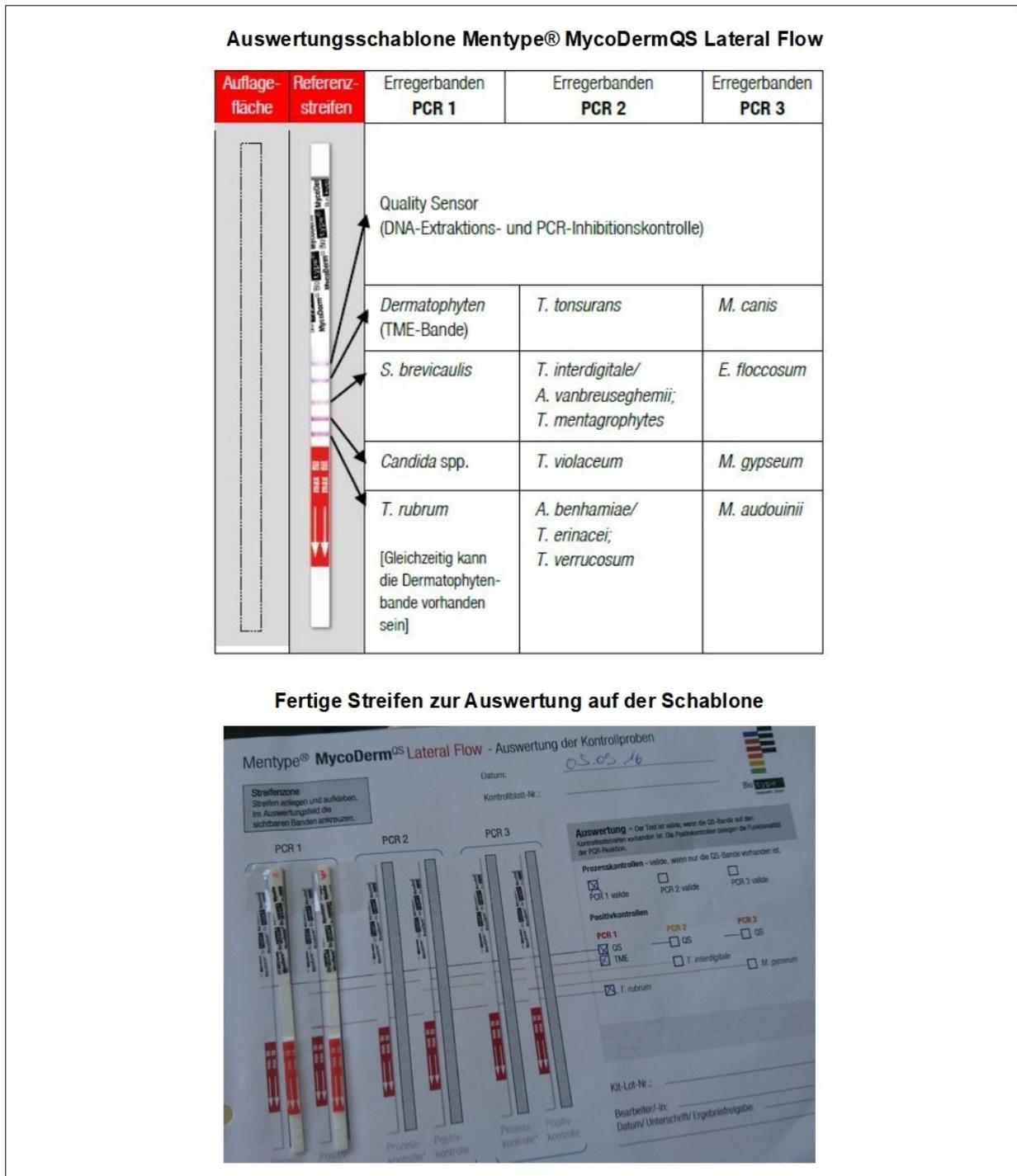


Abbildung 6: Auswertung Mentype® MycoDermQS Lateral Flow

Der linke Streifen zeigt lediglich die QS-Bande als Interne Kontrolle. Der rechte Streifen zeigt neben der QS-Bande eine Bande bei TME und bei *T. Rubrum*. Links ist somit kein Erreger nachgewiesen worden, rechts *T. rubrum*.

6.2.3.4 Erreger-Spektrum der PCR-Methoden

Eine Übersicht über die verschiedenen Spezies, die mit den einzelnen molekularen

Methoden nachgewiesen werden können, gibt Tabelle 13. FTD fasst die 20 Spezies in fünf Komplexen zusammen und auch bei MycoDerm sind nicht alle Erreger einzeln identifizierbar.

Tabelle 13: Erreger-Spektrum der PCR-Methoden

PCR/Erreger	Bergmans et al.	FTD	MycoDerm
<i>T. rubrum</i>	x	x	x
<i>T. violaceum/ soudanense</i>	x	x	x
<i>T. verrucosum</i>	x	x	x
<i>T. erinacei</i>	x	x	x
<i>T. erinacei 2/concentricum</i>	x	x	
<i>T. interdigitale</i>	x	x	x
<i>T. mentagrophytes</i>	x	x	x
<i>T. tonsurans</i>	x	x	x
<i>T. terreste</i>		x	
<i>T. schoenlenii</i>		x	
<i>T. eqinum</i>		x	
<i>T. fischeri</i>		x	
<i>T. kanei</i>		x	
<i>T. raubitschekii</i>		x	
<i>T. gourvillii</i>		x	
<i>T. megninii</i>		x	
<i>E. floccosum</i>	x		x
<i>M. canis</i>	x	x	x
<i>M. audouinii</i>	x	x	x
<i>M. ferrugineum</i>		x	
<i>M. gypseum</i>			x

<i>Candida spp.</i>	x
<i>S. brevicaulis</i>	x

6.2.3.5 Auswertungskriterien

Ein Lauf kann dann als valide gewertet werden, wenn alle Positivkontrollen (PC) positiv ausgefallen sind und alle Negativkontrollen (NC) negativ. Außerdem kann eine Probe nur valide als negativ gewertet werden, wenn die Interne Kontrolle (IC, bei MycoDerm als QS betitelt) positiv ist (s. Tabelle 14). Sollte eine Probe invalid sein, kann eine 1:10 Verdünnung des Eluats versucht werden.

Tabelle 14: Auswertungskriterien

Ergebnis Dermatophyten-DNA	Ergebnis IC	Endergebnis
negativ	positiv	valid: negativ
positiv	positiv	valid: positiv
positiv	negativ	valid: positiv
negativ	negativ	invalid

6.2.3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Open Source Software „Sofastats“ sowie der Software MedCalc; die graphische Darstellung in LibreOffice calc. In Abwesenheit einer „perfekten“ Methode als Goldstandard wurde ein Referenzwert aus den Ergebnissen aller fünf Methoden ermittelt, ähnlich der sogenannten „discrepant analysis“ [74]. Die Referenz wurde dann als positiv definiert, wenn entweder ein positives Kulturergebnis vorlag und/oder mindestens eine PCR-Methode ein eindeutig positives Ergebnis erbrachte.

Mit Hilfe einer ROC (Receiver Operating Characteristic)-Kurve kann die Qualität eines Testes eingeschätzt werden. Eine gute Methode liegt möglichst weit links oben. Analog dazu wurden in dieser Arbeit die verschiedenen Methoden verglichen.

7 Ergebnisse

7.1 Testungen mit Ringversuchsproben

Es wurden mit sieben Ringversuchsproben alle drei molekularen Methoden durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zu sehen. Dabei betragen Sensitivität und Spezifität jeweils 100 % für die In-house Methode und FTD. Das MycoDerm Kit kommt auch auf eine Sensitivität von 100 %, allerdings wegen der fehlerhaften Detektion von *Candida* spp. nur auf eine Spezifität von 66,7 %.

Tabelle 15: Ergebnisse mit Ringversuchen

Probe	Spezies	ID	Ergebnis PCR		
			Bergmans	FTD	MycoDerm
A	<i>Arthroderma benhamiae</i>	76,1	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes complex</i>	<i>T. spp.</i> von <i>A. benhamiae</i>
B	<i>M. canis</i>	93,2	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>
C	<i>T. tonsurans</i>	80,2	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>
D	<i>M. gypseum</i>	97,1	neg	neg	<i>M. gypseum</i>
2	<i>Trichosporon inkin</i>	73,1	neg	neg	neg
4	<i>Sarocladium / Acremonium kiliense</i>	41,0	neg	neg	neg
5	<i>Madurella mycetomatis</i>	60,8	neg	neg	<i>Candida spp.</i>

ID: Identifikationsrate unter allen Teilnehmern.

7.2 Sensitivität und Spezifität

Es wurden insgesamt 323 klinische Proben getestet, die ins Routinelabore zur Dermatophyten-Diagnostik eingegangen sind. Mit allen Proben wurden die drei molekularen Methoden durchgeführt, sowie Kultur und, je nach Labor, Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzmikroskopie mit Calcofluor.

Dabei waren in der Kultur 168 Proben positiv, bei der In-house PCR 164, bei FTD 224 und bei MycoDerm 202. Die Werte für die beiden verschiedenen Mikroskopie-Arten sind in dieser Arbeit sowohl einzeln berechnet worden, als auch zusammengefasst

unter „Mikroskopie gesamt“. Dabei zeigte die Lichtmikroskopie 64 positive Proben und die Fluoreszenzmikroskopie 172, insgesamt 236 (s. Abbildung 7).

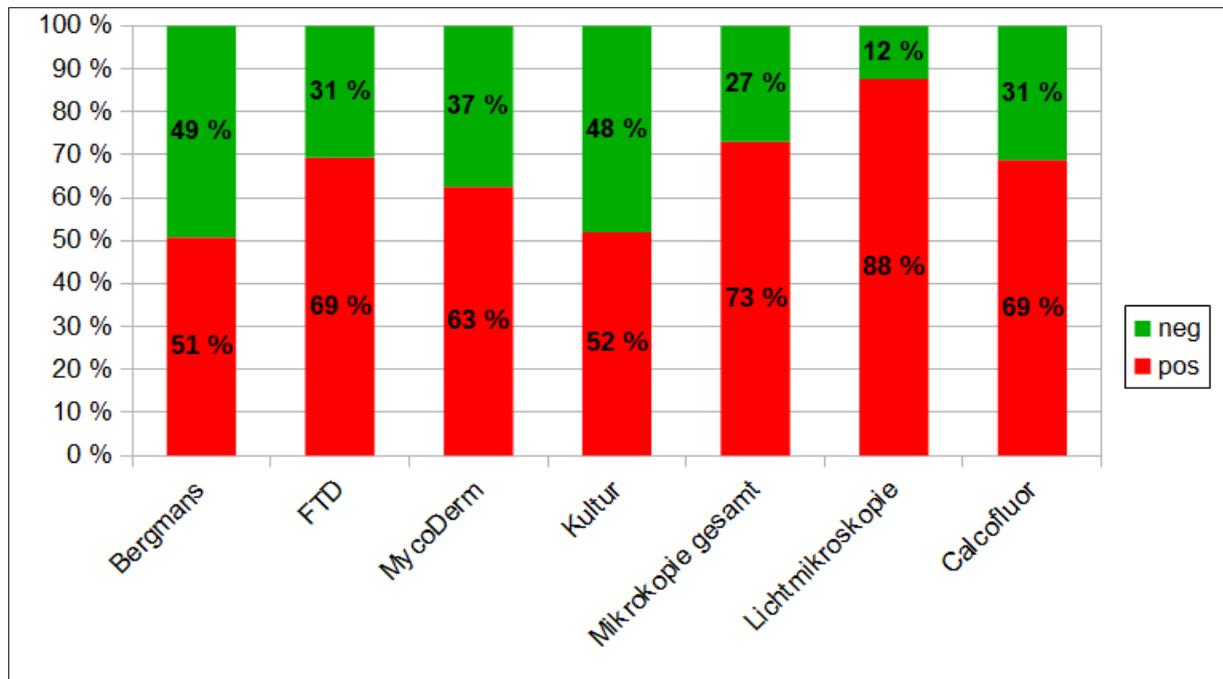


Abbildung 7: Positiv-Raten der verschiedenen Methoden

Rot dargestellt sind dabei die Anteile an Proben mit positivem Nachweis in den einzelnen Methoden, grün die Anteile ohne Nachweis.

Die Sensitivität und Spezifität sowie der Positiv Prädiktive Wert (PPV) und der Negativ Prädiktive Wert (NPV) inklusive 95 %-Konfidenzintervallen wurden zunächst mit der Kultur als Referenzmethode errechnet und sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 sowie Abbildung 8 dargestellt.

Tabelle 16: Sensitivität und Spezifität (Referenzmethode Kultur)

Methode	Sensitivität	CI 95 % Sensitivität	Spezifität	CI 95 % Spezifität
Mikroskopie gesamt	83,9 %	77,1 % bis 89,3 %	36,9 %	29,6 % bis 44,7 %
Lichtmikroskopie	82,7 %	69,7 % bis 91,8 %	0,0 %	0,0 % bis 16,1 %
Calcofluor (IF)	84,5 %	76,0 % bis 90,9 %	42,2 %	34,1 % bis 50,6 %
Bergmans	63,9 %	55,8 % bis 71,4 %	64,3 %	56,5 % bis 71,5 %
FTD	92,3 %	86,9 % bis 95,9 %	51,8 %	44,0 % bis 59,6 %
MycoDerm	82,6 %	75,7 % bis 88,2 %	56,0 %	48,1 % bis 63,6 %

Tabelle 17: Positiv und Negativ Prädiktiver Wert (Referenzmethode Kultur)

Methode	PPV (Präv. 20 %)	CI 95 % PPV	NPV (Präv. 20 %)	CI 95 % NPV
Mikroskopie gesamt	24,9 %	22,5 % bis 27,6 %	90,2 %	85,9 % bis 93,2 %
Lichtmikroskopie	17,1 %	15,4 % bis 19,0 %	0 %	-
Calcofluor (IF)	26,8 %	23,7 % bis 30,0 %	91,6 %	87,0 % bis 94,7 %
Bergmans	30,9 %	26,1 % bis 36,1 %	87,7 %	84,9 % bis 90,0 %
FTD	32,3 %	28,9 % bis 36,0 %	96,4 %	93,8 % bis 97,9 %
MycoDerm	31,9 %	28,0 % bis 36,1 %	92,8 %	89,9 % bis 94,9 %

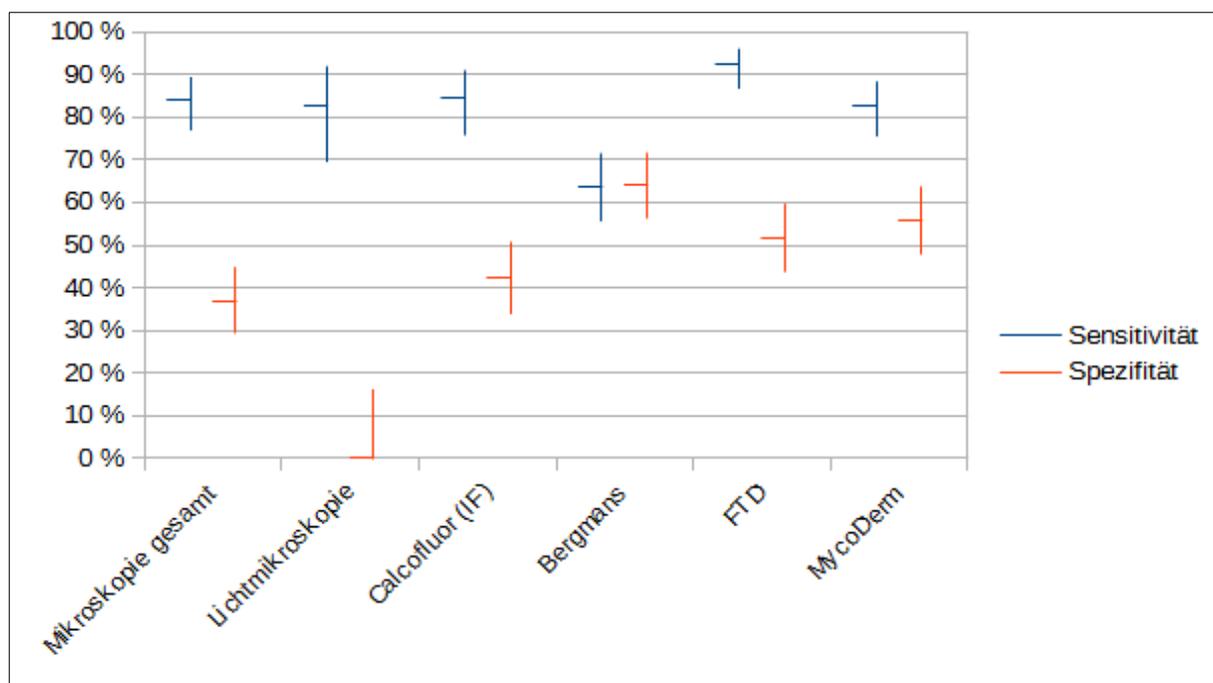


Abbildung 8: Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Methoden (Referenzmethode Kultur)

Darstellung der Sensitivität (blau) und Spezifität (orange) für die einzelnen Methoden. Der horizontale Strich bezeichnet dabei den eigentlichen Wert, der vertikale das 95 %-Konfidenzintervall.

Da die Kultur als nicht perfekter Goldstandard bekannt ist, wurde auch eine Analyse mit einem alternativen Referenzwert angefertigt. Dieser wurde dann als positiv definiert, wenn entweder Kultur und/oder mindestens eine PCR-Methode ein eindeutig positives Ergebnis erbrachten. Für diese Referenz sind 236 positive Proben ermittelt worden. Die daraus resultierenden Sensitivitäten und Spezifitäten sowie der

Positiv Prädiktive Wert (PPV) und der Negativ Prädiktive Wert (NPV) inklusive 95 %-Konfidenzintervallen sind in Tabelle 18, Tabelle 19 und Abbildung 9 dargestellt. Danach hat das FTD Kit die höchste Sensitivität mit 93,2 %. Der zweit-sensitivste molekulare Test ist MycoDerm mit 83,9 %, wohingegen die In-house Methode nur eine Sensitivität von 67,4 % aufweist. Alle drei molekularen Methoden waren hoch spezifisch mit Werten über 95 %.

Tabelle 18: Sensitivität und Spezifität (Referenzmethode Kultur und/oder mind. eine PCR)

Methode	Sensitivität	CI 95 % Sensitivität	Spezifität	CI 95 % Spezifität
Kultur	65,3 %	58,8 % bis 71,3 %	98,9 %	93,8 % bis 100,0 %
Mikroskopie gesamt	86,4 %	81,4 % bis 90,5 %	63,2 %	52,2 % bis 73,3 %
Lichtmikroskopie	87,1 %	77,0 % bis 94,0 %	0 %	0,0 % bis 70,8 %
Calcofluor (IF)	86,1 %	79,9 % bis 91,0 %	65,5 %	54,3 % bis 75,5 %
Bergmans	67,4 %	61,0 % bis 73,3 %	100,0 %	95,9 % bis 100,0 %
FTD	93,2 %	89,2 % bis 96,1 %	95,4 %	88,6 % bis 98,7 %
MycoDerm	83,9 %	78,6 % bis 88,4 %	95,4 %	88,6 % bis 98,7 %

Tabelle 19: Positiv und Negativ Prädiktiver Wert (Referenzmethode Kultur und/oder mind. eine PCR)

Methode	PPV (Präv. 20 %)	CI 95 % PPV	NPV (Präv. 20 %)	CI 95 % NPV
Kultur	93,4 %	66,9 % bis 99,0 %	91,9 %	90,5 % bis 93,1 %
Mikroskopie gesamt	37,0 %	30,8 % bis 43,7 %	94,9 %	92,9 % bis 96,4 %
Lichtmikroskopie	17,9 %	16,6 % bis 19,3 %	0,0 %	-
Calcofluor (IF)	38,4 %	31,6 % bis 45,7 %	95,0 %	92,6 % bis 96,6 %
Bergmans	100,0 %	-	92,5 %	91,1 % bis 93,6 %
FTD	83,5 %	66,0 % bis 93,0 %	98,3 %	92,0 % bis 97,1 %
MycoDerm	82,0 %	63,6 % bis 92,3 %	96,0 %	4,6 % bis 97,0 %

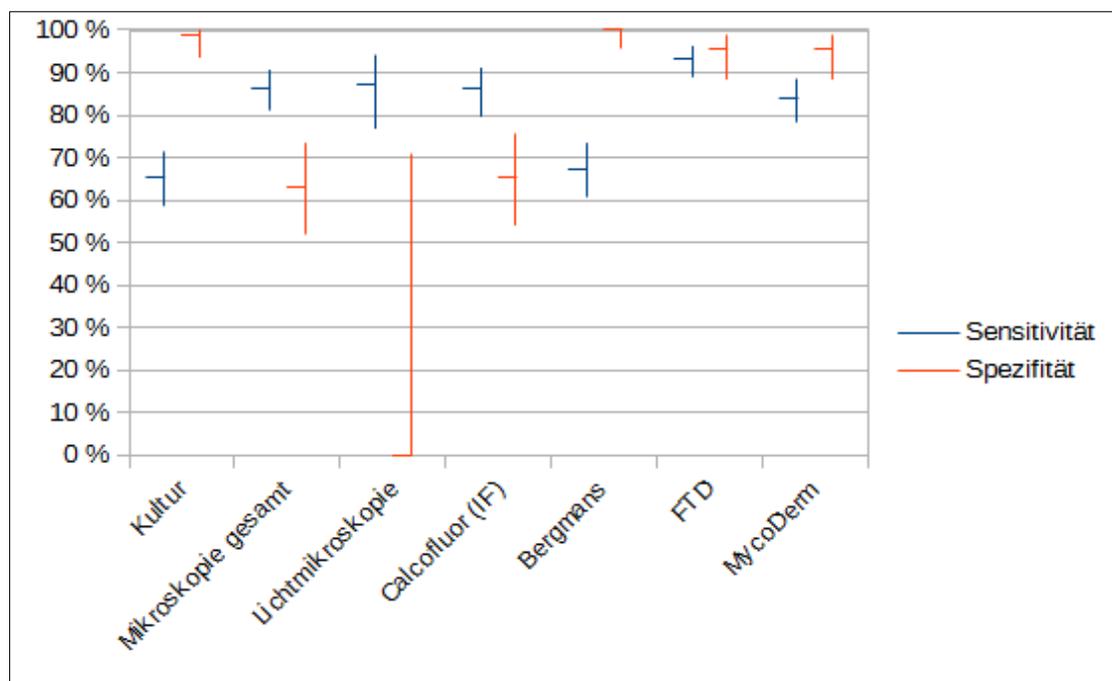


Abbildung 9: Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Methoden (Referenzmethode Kultur und/oder mind. eine PCR)

Darstellung der Sensitivität (blau) und Spezifität (orange) für die einzelnen Methoden. Der horizontale Strich bezeichnet dabei den eigentlichen Wert, der vertikale das 95 %-Konfidenzintervall.

Ein detaillierter Vergleich der Ergebnisse von Kultur, Mikroskopie und den einzelnen PCR-Methoden zeigt sich in Tabelle 20 bis Tabelle 22. Tabelle 23 zeigt den Vergleich, wenn mindestens eine PCR-Methode positiv war.

Tabelle 20: Detaillierter Vergleich der Ergebnisse für Bergmans et al.

Kultur	Mikroskopie	PCR Bergmans	Anzahl	%
-	-	-	55	17,0
+	+	+	89	27,6
+	+	-	41	12,7
+	-	+	10	3,1
-	+	+	53	16,4
+	-	-	15	4,6
-	+	-	53	16,4
-	-	+	7	2,2

Tabelle 21: Detaillierter Vergleich der Ergebnisse für FTD Dermatophytes

Kultur	Mikroskopie	PCR FTD	Anzahl	%
-	-	-	52	16,1
+	+	+	123	38,1
+	+	-	7	2,2
+	-	+	20	6,2
-	+	+	71	22,0
+	-	-	5	1,5
-	+	-	35	10,8
-	-	+	10	3,1

Tabelle 22: Detaillierter Vergleich der Ergebnisse für MycoDerm

Kultur	Mikroskopie	PCR MycoDerm	Anzahl	%
-	-	-	52	16,1
+	+	+	115	35,6
+	+	-	15	4,6
+	-	+	13	4,0
-	+	+	64	19,8
+	-	-	12	3,7
-	+	-	42	13,0
-	-	+	10	3,1

Tabelle 23: Detaillierter Vergleich der Ergebnisse für alle PCR-Methoden zusammengefasst

Kultur	Mikroskopie	PCR	Anzahl	% 100 %=323
-	-	-	47	14,6
+	+	+	127	39,3
+	+	-	3	0,9
+	-	+	21	6,5
-	+	+	75	23,2
+	-	-	4	1,2
-	+	-	31	9,6
-	-	+	15	4,6

7.3 Erreger-Spektrum

Eine Verteilung der Häufigkeit der Erreger in dieser Arbeit ist in Abbildung 10 zu sehen. Die nachgewiesenen Erreger waren zu 98,3 % Dermatophyten und nur zu 1,3 % *Candida spp.* bzw. 0,4 % *Scopulariopsis*. In dieser Arbeit war *T. rubrum* mit 83,3 % der mit Abstand häufigste Erreger, gefolgt von *T. interdigitale* mit 7,1 %. Deutlich weniger häufig wurden *T. mentagrophytes* mit 2,5 % und *T. tonsurans* mit 3,3 % nachgewiesen.

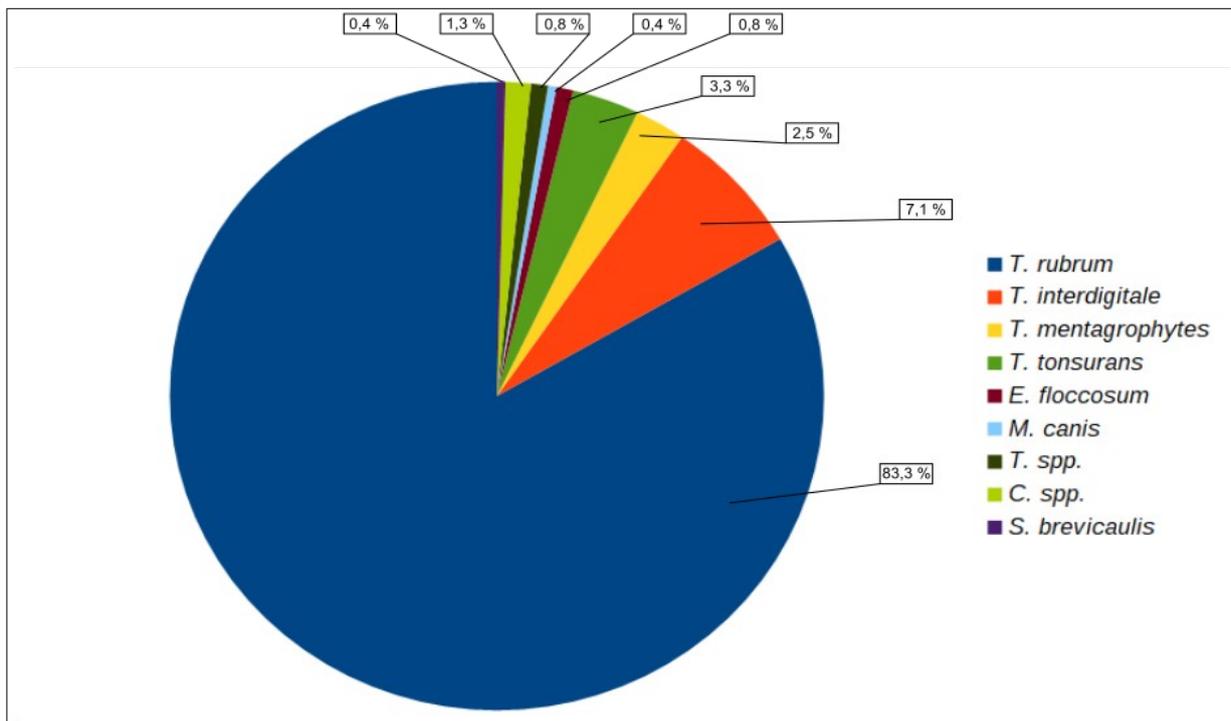


Abbildung 10: Häufigkeit der Erreger

Abbildung 11 zeigt die am häufigsten nachgewiesenen Erreger für die einzelnen Methoden. Da in den PCR-Methoden *T. interdigitale* und *T. mentagrophytes* nicht immer differenziert werden konnten, sind diese Zahlen zusammengefasst.

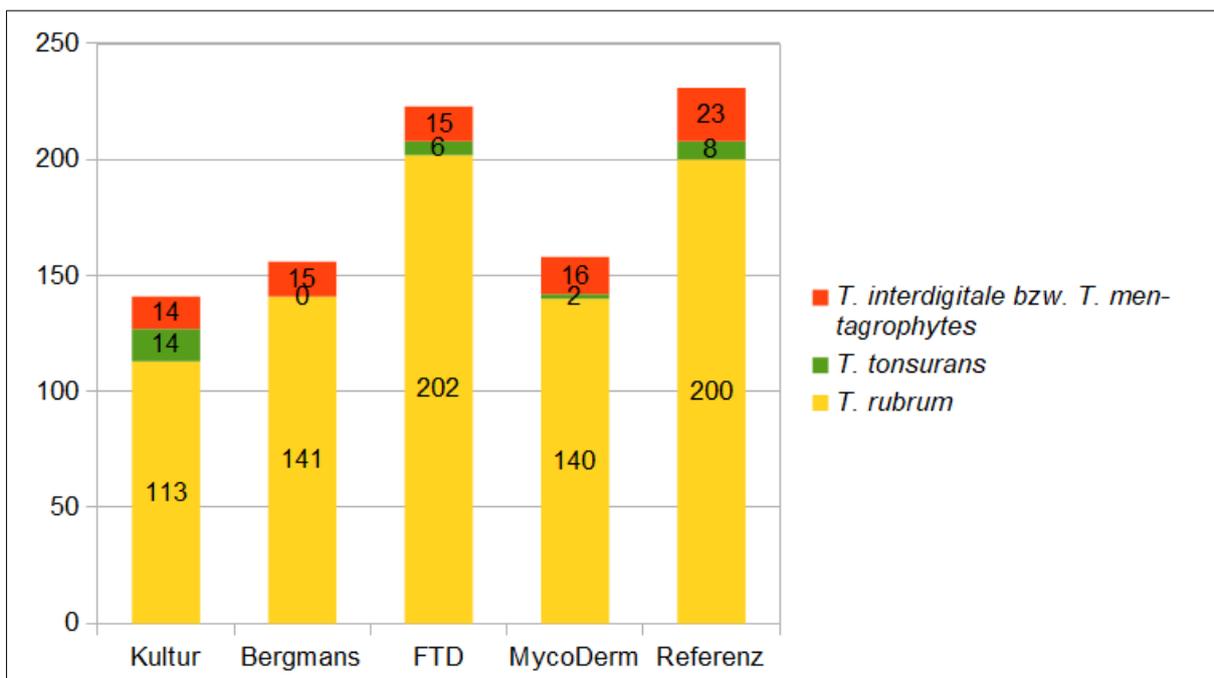


Abbildung 11: Am häufigsten nachgewiesene Erreger für die einzelnen Methoden

In den meisten Fällen stimmten die Ergebnisse auf Spezies-Ebene zwischen PCR und Kultur überein.

7.4 Misch-Infektionen

Mit der PCR-Methode von FTD wurden in einem Fall in derselben Probe zwei verschiedene Dermatophyten nachgewiesen. Bei den anderen beiden Methoden gelang immer nur der Nachweis eines Erregers. In einigen Fällen sind in der Kultur bakterielle Erreger nachgewiesen worden, während in der PCR Dermatophyten detektiert wurden. Dabei waren fast ausschließlich *Pseudomonas spp.* die bakterielle Komponente (s. Tabelle 24).

Tabelle 24: Misch-Infektionen mit *Pseudomonas*

Proben-Material	Direkt-Mikroskopie	Kultur	PCR		
			Bergmans et al	FTD	MycoDerm
Nagel	pos	<i>Pseudomonas species</i>	neg	neg	neg
Nagel	pos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
Nagel	pos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
Nagel	pos	<i>Pseudomonas species</i> , <i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
Nagel	pos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	neg	neg	neg
Nagel	pos	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>T. interdigitale</i>	neg	<i>T. interdigitale</i>
Nagel	pos	<i>Pseudomonas species</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
Nagel	pos	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Pseudomonas species</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> / <i>violaceum</i>	<i>T. violaceum</i>
Nagel	pos	<i>Pseudomonas koreensis</i> , <i>T. species</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
Nagel	neg	<i>Pseudomonas species</i> , <i>C. spp.</i>	neg	neg	neg
Nagel	neg	<i>Pseudomonas species</i>	neg	neg	neg
Nagel	neg	<i>Pseudomonas koreensis</i> , <i>Streptomysp</i>	neg	neg	neg

7.5 Praktikabilität

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, die Praktikabilität der drei molekularen Methoden zu vergleichen. Die Kategorien hierfür waren: Hands-on time, Kosten, erforderliche spezielle technische Ausrüstung, Automatisierungspotenzial und Komplexität. Unsere Einschätzung dieser Faktoren ist in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Praktikabilität der Methoden

Methode	Bergmans et al.	FTD	MycoDerm
Hands-on time (bei 24 Proben)	140 min	130 min	165 min
Kosten	€	€	€€
erforderliche technische Ausrüstung	LightCycler® 2.0	LightCycler® 480	Thermocycler
Automatisierungs- -Potenzial	in gewissem Maße möglich	fast vollständig möglich	nur die DNA-Isolierung
maximale Anzahl Proben in einem Lauf	29	45	abhängig von der Kapazität des Thermocyclers (hier: 23)
Komplexität	sehr komplex	sehr einfach	einfach
besondere Vorteile	Real-time PCR, single tube	Real-time PCR, CE, IVD	NDM, Stufendiagnostik, CE, IVD

8 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, drei molekulare Methoden sowohl untereinander, als auch mit den herkömmlichen Methoden, Kultur und Mikroskopie, zu vergleichen. Weiterhin sollten diese neuen Tests auf ihre Praktikabilität und die Möglichkeit, sie in einem Routinelabor zu etablieren, geprüft werden. Eine Diskussion dieser Ergebnisse ist im Folgenden zu lesen.

In der Literatur sind allgemeine Angaben für die Sensitivität der PCR in der Dermaphyten-Diagnostik von 85 bis > 90 % zu finden [18,49].

Es wurden in dieser Arbeit die Parameter Sensitivität und Spezifität sowohl im Vergleich mit der Kultur ermittelt als auch mit einer neu definierten Referenz. Dieses Vorgehen ist bei der Testung neuer Methoden in Abwesenheit einer sicheren Methode als Goldstandard üblich. Problem an dieser statistischen Methode ist allerdings, dass man den neuen Test quasi mit sich selbst vergleicht [74]. Da aber alle drei Methoden in die neue Referenz einfließen, relativiert sich dieser Bias hier wieder. Alle drei Tests haben dabei deutlich bessere Werte gezeigt als im Vergleich zur Kultur.

Überraschend war daher das schlechte Abschneiden der In-house Methode nach Bergmans et al.. Studien zum Einsatz dieser Methode in der Routine-Diagnostik sind als Vergleichsmöglichkeit nicht bekannt. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Modifizierung der Methode in dieser Arbeit. Es wurde eine neue Interne Kontrolle hinzugefügt. Allerdings wurden nach der Etablierung der IC kleine Testreihen mit bereits getesteten Proben gemacht. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der qualitativen Analyse und auch die Ct- und Tm-Werte waren ähnlich. Eine andere Theorie war, dass die Methode sehr sensitiv auf das Einfrieren und Auftauen der Eluate reagiert oder die DNA nicht lang genug stabil ist. Daher wurde die PCR mit der Bergmans-Methode meist als erstes gemacht. Das hatte allerdings keinen Effekt auf die Positivraten der Methode.

Während der Testung dieser Methode hat sich noch ein weiteres Problem herauskristallisiert. Die Schmelzpunkte liegen z.T. sehr dicht aneinander (s. Tabelle 26). So beträgt der Abstand zwischen *Trichophyton violaceum/soudanense* und *Trichophyton rubrum* im Kanal 640 z.B. nur 0,05°C. Bei *Trichophyton erinacei 2/concentricum* und *Trichophyton erinacei* gehen die Bereiche sogar nahtlos ineinander über. Eine klare

Trennung auf Spezies-Ebene, wie in der Publikation beschrieben, konnten wir leider nicht bestätigen. In der Praxis allerdings sind die Schwankungen zwischen verschiedenen Läufen und Geräten zu groß, um sich auf die angegebenen Intervalle verlassen zu können. Es wäre möglich, wenn man in jedem Lauf bekannte Proben als Standard für jeden der elf Keime mitlaufen lassen würde. Dies zu etablieren ist allerdings sehr aufwändig und kostspielig, sodass in dieser Arbeit darauf verzichtet wurde. Stattdessen wurde ein Kanal zu einem Komplex zusammengefasst, ähnlich wie es in der Methode von FTD gehandhabt wird.

Tabelle 26: Schmelzpunkte Bergmans et al[72].

Spezies	Kanal	Schmelzpunkt Tm in °C
<i>Microsporium audouinii</i>	610	60,00 – 62,00
<i>Microsporium canis complex</i>	610	65,00 – 67,50
<i>Trichophyton erinacei 2/concentricum</i>	640	60,00 – 61,00
<i>Trichophyton erinacei</i>	640	61,00 – 62,20
<i>Trichophyton verrucosum</i>	640	62,30 – 64,00
<i>Trichophyton violaceum/soudanense</i>	640	64,50 – 66,25
<i>Trichophyton rubrum</i>	640	66,30 – 68,00
<i>Trichophyton tonsurans</i>	670	56,60 – 58,60
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	670	59,90 – 61,90
<i>Trichophyton interdigitale</i>	670	64,00 – 66,00
<i>Epidermophyton floccosum</i>	705	67,50 – 69,50
Interne Kontrolle	705	59,00 – 61,00

Die Methode von FTD hat in dieser Arbeit die höchste Sensitivität mit 93,2 % und ist mit 95,4 % auch sehr spezifisch. Analog zu einer ROC-Kurve sind in Abbildung 12 die Sensitivitäten und Spezifitäten der verschiedenen Methoden dargestellt. Die FTD-Methode liegt dabei am weitesten in der linken oberen Ecke und hat dementsprechend die beste Kombination aus Sensitivität und Spezifität.

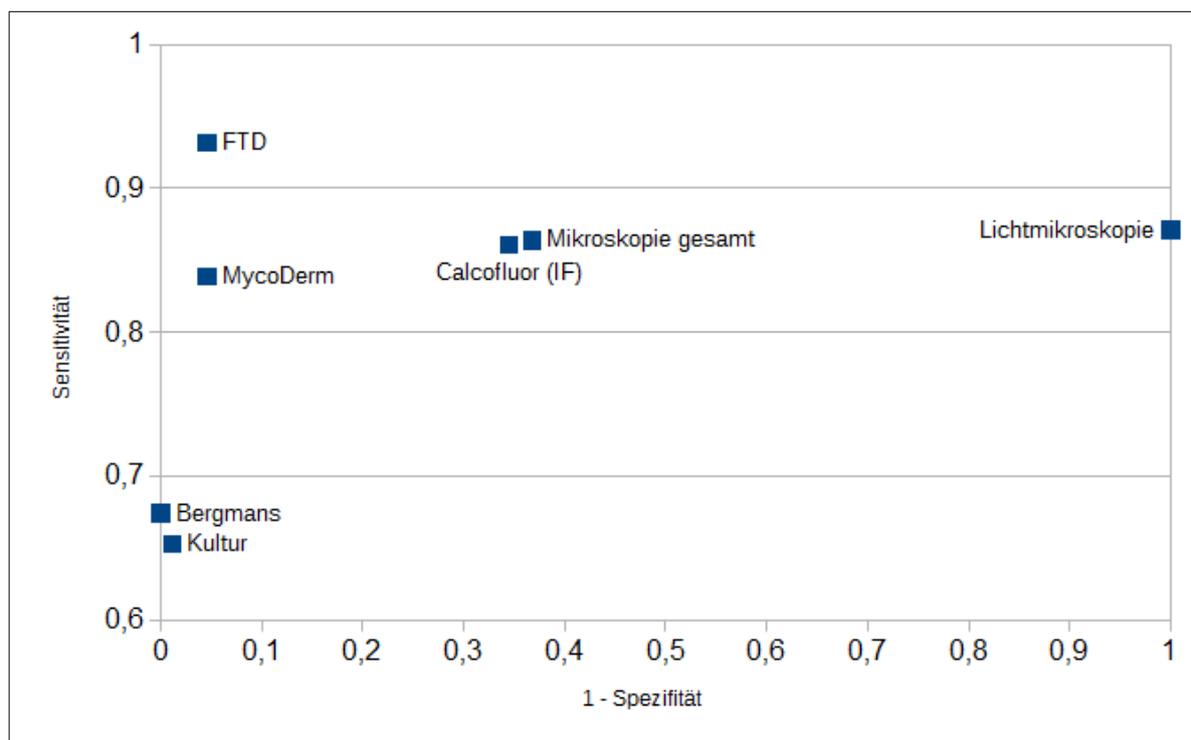


Abbildung 12: Darstellung der Methoden analog einer ROC-Kurve

Dabei wird die Sensitivität auf der y-Achse aufgetragen. Die Spezifität wird von 1 subtrahiert und dann auf der x-Achse aufgetragen. Je sensibler und spezifischer eine Methode ist, desto näher liegt sie an der linken oberen Ecke.

Bis zum Abschluss der Literaturrecherche sind noch keine Studien mit klinischen Proben mit diesem Test veröffentlicht worden [48,75], weshalb ein Vergleich auch hier nicht möglich ist. Auffällig war, dass der Nachweis von *Microsporum canis* technisch weniger optimal erfolgt. Sowohl bei der klinischen Probe als auch bei der Probe aus Ringversuchsmaterial gab es nur ein schwaches Signal in dem Kanal.

Das MycoDerm Kit zeigt in der vorliegenden Studie eine Sensitivität von 83,9 % und eine Spezifität von 95,4 %. In einer Arbeit von Mehlig et al. finden sich ähnliche Werte mit 87,3 % und 94,3 %. Auch da wurden klinische Proben getestet; allerdings wurden für die Referenz nur Kultur und Direkt-Mikroskopie herangezogen. Zu dem handelt sich um eine ältere Variante des Kits, bei dem die Detektion mittels Agarose-Gel und nicht mit Lateral Flow Streifen erfolgt [73].

Bei den Testungen dieser Methode fiel auf, dass häufig in PCR 1 eine TME-Bande erschien (erfasst die Erreger, die auch mit PCR 2 und 3 erfasst werden), PCR 2 und 3 aber negativ blieben. Dieses Ergebnis haben wir dann als *Trichophyton spp.* bewertet.

Oft zeigten Kultur (in 43 % der Fälle) oder eine der anderen PCR-Methoden (73 %) *T. rubrum*, welcher eigentlich in PCR 1 erfasst werden sollte. Entweder war die Bande dort zu schwach ausgeprägt, oder es gibt *Trichophyton rubrum* Stämme, die mit dieser Methode nicht erfasst werden. Auch hier stellt sich allerdings die Frage der klinischen Relevanz der eindeutigen Spezies-Identifikation.

In den letzten Jahren sind viele molekulare Methoden veröffentlicht worden und einige sind auch kommerziell erhältlich. Allerdings ist es nicht einfach, eine geeignete Methode für ein bestimmtes Labor zu finden. Diese Entscheidung hängt von verschiedenen Faktoren ab: Ein wichtiger Aspekt ist die bereits vorhandene technische Ausstattung des Labors. So würde sich wahrscheinlich kein Labor einen, verhältnismäßig teuren, LightCycler® nur für die Dermatophyten-Diagnostik anschaffen. Auch die Expertise des Personals muss in diesen Prozess mit einfließen. Real-time PCR ist eine elegante Methode, aber in Laboren, die bisher nur Erfahrungen mit konventioneller PCR gemacht haben, ist die MycoDerm-Methode mit Lateral Flow Streifen eine sehr gute Alternative.

Die Kosten der PCR Kits an sich sind ein weiterer wichtiger Faktor. Überraschenderweise gab es diesbezüglich keinen großen Unterschied zwischen In-house Methode und FTD Kit. Das MycoDerm Kit ist jedoch unterm Strich etwas teurer, vor allem wenn alle 3 PCRs durchgeführt werden.

Die kürzeste Hands-on time hat das FTD Kit mit 130 Minuten, dicht gefolgt von der In-house Methode mit 140 Minuten. Auch hier zeigt das MycoDerm Kit einen Nachteil, weil es mit 165 Minuten wesentlich länger Personal bindet. Allerdings sind beide kommerziellen Kits in der Handhabung deutlich einfacher als die In-house Methode. Alleine das Errechnen und Herstellen der Gebrauchslösungen und des Master-Mixes sind sehr kompliziert und fehleranfällig.

Das FTD Kit ist theoretisch nahezu vollständig automatisierbar. Die Vorbereitung zum Verdau über Nacht muss händisch erfolgen. Da es Extraktionsgeräte gibt, die direkt Eluat in eine LightCycler®-Platte pipettieren, müsste nur noch Mix zugegeben werden. Dagegen erfordert die MycoDerm-Methode sehr viel Handarbeit und bietet aktuell sehr wenig Möglichkeit zur Automatisierung. Dies fällt nicht so stark ins Gewicht, wenn nur wenige Proben gleichzeitig bearbeitet werden müssen. Wird allerdings ein hohes Probenaufkommen erwartet, kann auch entscheidend sein, wieviele

Proben maximal in einem Lauf abgearbeitet werden können. Auch da liegt FTD mit 45 Proben vorn, während Bergmans nur 29 Proben bestimmen kann. Bei MycoDerm ist diese Zahl abhängig von der Kapazität des genutzten Thermocyclers (bei uns 23).

Das MycoDerm Kit detektiert mit *Scopulariopsis brevicaulis* und *Candida spp.* auch den am häufigsten vorkommenden Schimmelpilz bei Dermatomykosen sowie die häufigsten Hefen. Es können also auch wichtige Differentialdiagnosen erfasst werden. Weitere Besonderheit der Methode ist die Stufendiagnostik. *T. rubrum*, Schimmelpilz und Hefen können in der ersten PCR nachgewiesen werden. Sollte eine weitere Differenzierung der deutlich selteneren anderen Dermatophyten nötig sein, können PCR 2 und 3 angeschlossen werden. Dies war bei uns nur in 19 % der Fälle bzw. 30 % der positiven Proben nötig; es wurden bei unseren 323 Proben insgesamt je sieben Läufe mit PCR 2 und 3 angesetzt.

Eine Identifikation auf Spezies-Ebene ist nur mit der In-house Methode möglich. Aber auch diese zeigt dabei einige Schwächen (s.o.). Die beiden kommerziell erhältlichen Kits erlauben größtenteils nur eine Bestimmung auf Genus-Ebene, da einige Spezies zu Komplexen zusammengefasst sind und nicht separat bestimmt werden können. Wie bereits erwähnt, stellt sich hier aber die Frage nach der klinischen Relevanz. Die Therapie ist oft vor allem von der Lokalisation und dem klinischen Bild abhängig.

Vorteil der beiden Real-time PCR-Methoden (In-house Methode und FTD) ist das geringere Kontaminationsrisiko. Da die Reaktionsgefäße nach der PCR nicht mehr geöffnet werden müssen, wird die gefürchtete Verbreitung von amplifizierter DNA vermieden, was sonst zu einer Verunreinigung einzelner Proben oder sogar des ganzen Labors führen könnte.

Es war nicht Ziel dieser Arbeit, eine Prävalenz für Dermatomykosen oder einzelne Erreger zu ermitteln. Nichtsdestotrotz sollen die Beobachtungen zu Häufigkeiten der Erreger in dieser Arbeit kurz diskutiert werden.

Es wurden zu 98,3 % Dermatophyten nachgewiesen, der Anteil an Hefen betrug 0,9 % und der an Schimmelpilzen 0,3 %. Dazu ist allerdings zu sagen, dass nur mit einer PCR-Methode überhaupt Hefen und Schimmelpilze nachgewiesen werden können - und da auch nur *Candida spp.* und *Scopulariopsis brevicaulis* als die klinisch wichtigsten Vertreter. Die Aussagekraft dieser Werte ist also stark limitiert. Die Angaben in der Literatur weisen große Schwankungen auf. Für England sind aller-

dings ähnliche Werte bekannt [5]. Berücksichtigt man auch die Kultur-Ergebnisse mit Pilzgattungen, die von den PCR-Methoden nicht nachgewiesen werden können, kommt man auf folgende Verteilung: Dermatophyten 92,6 %, Hefen 2,8 % und Schimmelpilze 4,7 %.

Als mit Abstand häufigster Erreger ist mit 83,3 % *T. rubrum* nachgewiesen worden, gefolgt von *T. interdigitale* mit 7,1 %. Der Anteil dieser Keime an den nachgewiesenen Dermatophyten beträgt 84,7 % bzw. 7,2 %. Da nicht immer eine Unterscheidung zwischen *T. interdigitale* und *T. mentagrophytes* gemacht werden konnte, wurden diese bei unserer Auswertung zusammengefasst. Dann beträgt ihr Anteil an den Dermatophyten 9,7 %. Dies deckt sich mit den Zahlen aus Studien in Deutschland (91 % bzw. 7,7 % [3]) und Stockholm (83 % bzw. 7,4 % [6]).

Zwischen den einzelnen Methoden konnten keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit der einzelnen Erreger festgestellt werden. Auffallend ist jedoch, dass kein *T. tonsurans* mit der In-house Methode nachgewiesen werden konnte. Dies kann wie oben beschrieben an den recht nah beieinander liegenden Schmelzpunkten liegen (s. Tabelle 26). In der Kultur wiederum wurde *T. tonsurans* deutlich häufiger nachgewiesen als mit den anderen Methoden. Dafür zeigt die Kultur eine geringere Rate an *T. rubrum*-Nachweisen. Dies zeigt, dass auch in der Kultur eine Differenzierung auf Spezies-Ebene nicht immer einfach ist. Wie oben bereits beschrieben, ergibt sich allerdings aus diesen diagnostischen Unterschieden keine therapeutische Relevanz.

Bezüglich der Misch-Infektionen gab es mehrere Auffälligkeiten: Die erste war, dass in unseren Proben relativ wenig Misch-Infektionen auftraten. In der Literatur gibt es dazu stark schwankende Angaben. So beschreibt eine Studie einen Anteil von 22 % [3], eine andere aus Kanada erwähnt 5,5 % Infektionen mit sowohl Dermatophyten als auch *Non-Dermatophyte Molds* [76]. Außerdem fiel auf, dass es nur einen Fall mit einem gleichzeitigen Nachweis von zwei verschiedenen Dermatophyten in derselben PCR gab. Bezüglich der bakteriellen Erreger fiel eine Häufung von *Pseudomonas*-Nachweisen in der Kultur bei gleichzeitigem Nachweis von Dermatophyten in der PCR auf. Andere Bakterien waren kaum nachweisbar. Die wahrscheinlichste Erklärung ist eine Resistenz besonders von *Pseudomonas spp.* gegen die antibakteriellen Zusätze in den Nährmedien.

Es wurden sieben Proben aus RV-Material mit den drei molekularen Methoden

getestet. Die Ergebnisse fielen größtenteils wie erwartet aus [77,78]. Alle drei Methoden erfassten *M. canis* und *T. tonsurans* korrekt. *Trichosporon inkin* und *Sarocladium / Acremonium kiliense* sind bei keinem Test im Erreger-Spektrum enthalten und fielen dementsprechend bei allen negativ aus. Die beiden Real-time PCRs sind nicht in der Lage, *M. gypseum* zu detektieren, und blieben wie erwartet negativ, während das MycoDerm Kit einen korrekten Nachweis lieferte. Problematisch waren die Proben A und 5. Keine der Methoden kann *Madurella mycetomatis* nachweisen. Allerdings detektierte das MycoDerm Kit hier fälschlicherweise eine *Candida spp.* *Madurella mycetomatis* gilt als schwierig zu differenzieren und nur 61 % der RV-Teilnehmer gelang die korrekte Identifizierung. Eine allgemeine Kontamination der Reagenzien und Materialien oder ein systematischer Fehler sind unwahrscheinlich, da die Nachweisrate von *Candida spp.* insgesamt eher in einem niedrigen Bereich liegt. Es ergibt sich hier also ein falsch positives Ergebnis durch eine Kontamination speziell dieser Probe. Eine erneute DNA-Aufreinigung und Testung war jedoch aufgrund von zu wenig Material leider nicht möglich.

Die Ergebnisse bei Probe A verdeutlichen ein Problem in der Dermatophyten-Diagnostik: Die verwirrende Taxonomie. Es ist unmöglich, die zoophilen Stämme von *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* und *T. spp.* von *Arthroderma (A.) benhamiae* morphologisch zu differenzieren. Mit den neuen Erkenntnissen aus molekularbiologischen Untersuchungen wurde eine neue Einteilung eingeführt. Der frühere *T. mentagrophytes complex* wird jetzt in vier Spezies aufgeteilt [67,79]:

- *T. mentagrophytes* (zoophil, phylogenetisch verwandt mit *A. simii*)
- *T. erinacei* (zoophil, phylogenetisch verwandt mit *A. benhamiae*)
- *T. spp.* von *A. benhamiae* (zoophil, phylogenetisch verwandt mit *A. benhamiae*)
- *T. interdigitale* (zoophil und anthropophil, phylogenetisch verwandt mit *A. vanbreuseghemii*)

Weder die In-house Methode noch FTD erwähnen *T. spp.* von *A. benhamiae*. Bei beiden sind nur *T. mentagrophytes* und *T. interdigitale* aufgeführt und können bei FTD nicht differenziert werden. Bei der In-house Methode funktioniert dies aus oben genannten Gründen nur suboptimal. Lediglich das MycoDerm Kit macht eine klare Trennung zwischen *T. mentagrophytes* und *T. interdigitale* auf der einen und *T. spp.* von *A. benhamiae* auf der anderen Seite. Nur hier kann also die korrekte Diagnose

gestellt werden.

Die RV 2, 4 und 5 gehören zur RV-Gruppe „Sprossspitze, Hyphomyzeten“ und wären somit eigentlich also auch nicht mit einem Dermatophyten-Test bearbeitet worden. Die RV A bis D hingegen gehören zur RV-Gruppe „Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze“, und sind daher die geeigneteren Proben. Hier waren die Ergebnisse, einmal von taxonomischen Spitzfindigkeiten abgesehen, sehr gut.

Eines der wichtigsten Kriterien bei der Auswahl einer geeigneten Methode sind die Qualitätsstandards. Es gibt zwei Leitlinien bezüglich der Testung von molekularen Methoden: Die „Mikrobiologisch-infektiologischen Qualitätsstandards (MIQ)“ für Nukleinsäure-Amplifikationstechniken [80] und die MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments [81]. In einem Übersichts-Artikel führen Gräser et al. die wichtigsten Punkte dieser Richtlinien, die beachtet werden sollten auf [57].

- Technische Ausstattung:

- Separate Räume:

In dem Labor, in dem die Testungen durchgeführt wurden, herrscht ein Einbahnstraßen-Prinzip, d.h. es gibt verschiedene Räume für Probenbearbeitung, Mix-Ansatz, PCR-Ansatz und Detektion und der Wechsel zwischen den Räumen erfolgt nur in eine Richtung. Dinge, die sich einmal im Detektions-Raum befanden, kommen zum Beispiel nie wieder zurück in den Ansatz-Raum. Vor dem Detektions-Raum ist eine Schleuse, in der das Personal den Kittel wechselt. So wird die Kontamination des Labors mit Amplifikaten aus vorhergehenden PCRs verhindert.

- Aerosol-resistente Pipettenspitzen:

Es wurden für alle PCR-relevanten Schritte ausschließlich sterile Pipettenspitzen mit Filter benutzt, um Aerosol-Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

- Sicherheitswerkbank:

Die Vorbereitung der Proben für die Aufreinigung fand vollständig unter einer Lamina Air Flow Werkbank statt.

- Außerdem waren nahezu alle Verbrauchsmaterialien RNase-, DNase-, DNA-

und Pyrogen-frei.

- Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse:
 - Es sollten 10 % der Proben Pilz-frei sein und dabei das gleiche Proben-Material haben. In diesem Falle wurden 55 Haar- und Nagel-Proben getestet (17 %), die weder in der Mikroskopie noch in der Kultur Hinweise auf Dermatophyten gezeigt haben. 40 dieser Proben (12 %) zeigten keinerlei Hinweise auf Pilze.
 - Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung des Kontaminations-Risikos ist die Verwendung von Uracil-DNA Glykosylase (UDG). Dadurch werden die PCR-Produkte nach der Analyse zerstört und können somit die folgenden Untersuchungen nicht beeinflussen. Voraussetzung dafür wäre allerdings die Verwendung von dUTP statt dTTP. Dies wurde jedoch in keiner der drei verwendeten Methoden praktiziert.
 - Eine Kreuz-Hybridisation der Primer, Sonden und humaner DNA sollte ausgeschlossen werden. So sollten phylogenetisch verwandte Spezies und mögliche Differentialdiagnosen getestet werden. Da die beiden kommerziell erhältlichen Kits CE und IVD zertifiziert sind und dieser Aspekt in der Publikation der In-house Methode bereits beschrieben ist, wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet.
- Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse:
 - DNA-Extraktion:

Es wird empfohlen, verschiedene Methoden zur DNA-Aufreinigung zu testen. In dieser Arbeit wurden die Ringversuchsproben mit einer anderen Methode aufgereinigt (MAGNA Pure, Roche Diagnostics). Das Fast Track Diagnostik-Manual empfiehlt eindeutig die Extraktion mit dem NucliSENS® EasyMAG®. Ein direkter Vergleich zweier Aufreinigungs-Methoden fand allerdings nicht statt.
 - Interne Kontrolle:

Um Inhibitoren der PCR zu erkennen, sollte bei jeder Probe eine Interne Kontrolle mitgeführt werden. Im Falle der beiden kommerziellen Kits wird diese schon vor der Aufreinigung zugegeben, sodass es sich sowohl um eine Extraktions- als auch um eine Amplifikations-Kontrolle handelt. Bei der In-house Methode wurde ein Plasmid bei der PCR eingesetzt, also nur eine Amplifikations-Kontrolle durchgeführt.

- Menge des eingesetzten Materials bzw. analytische Sensitivität:
Auch hier wurde mit Verweis auf die Originalarbeit der In-house Methode und die Zertifizierung der kommerziell erhältlichen Methoden auf eine Untersuchung dieser Punkte verzichtet. Es ging hier vor allem um einen Vergleich zwischen den drei Methoden. Dies wurde erreicht, indem alle drei Methoden aus dem gleichen Eluat durchgeführt wurden.
- Misch-Infektionen:
Gerade bei Multiplex-PCRs ist es interessant, ob eine Methode Misch-Infektionen erfassen kann. Wir hatten leider nur einen Fall beim FTD Kit, in dem zwei Dermatophyten in einer Probe nachgewiesen wurden, ohne dass es ein Korrelat dafür in der herkömmlichen Diagnostik oder den anderen beiden PCRs gab.
- PCR Format:
 - Wie bereits erwähnt, ist die Real-time PCR schneller und weniger kontaminationsanfällig als konventionelle PCR-Methoden. Zwei der hier genutzten Tests sind Real-time PCRs.
- Statistische Analyse:
 - Es sollten diagnostische Sensitivität, Spezifität, Positiver (PPV) und Negativer Prädiktiver Wert (NPV) angegeben werden. Die ersten beiden Parameter sollten im Ideal-Fall um die 95 % betragen. Dies ist bei keiner Methode der Fall. Allerdings wird im Übersichtsartikel auch darauf hingewiesen, dass es bekanntermaßen schwierig ist, eine neue, sensitivere Methode anhand des weniger sensitiven bzw. spezifischen Goldstandards zu vergleichen. Lösungsvorschläge für dieses Problem werden nicht genannt, sodass in dieser Arbeit das oben beschriebene Verfahren angewandt wurde.

Die Nutzung molekularer Methoden ist aus der Diagnostik von Dermatomykosen nicht mehr wegzudenken. Mit der steigenden Verbreitung molekularer Methoden in anderen Bereichen - (nicht nur) der mikrobiologischen Diagnostik - werden in Zukunft die technischen Gegebenheiten auch breiter verfügbar sein. Einige Labore haben bereits ihren Algorithmus entsprechend umgestellt und führen eine Pan-Dermatophyten-PCR als eine Art Screening-Test durch, an die sich im positiven Falle

Mikroskopie, Kultur und ggf. eine weitere PCR anschließen. Entgegen einiger Meinungen in der Literatur werden die herkömmlichen Methoden Mikroskopie und Kultur allerdings nicht allzu bald ersetzt werden [65]. Wenn keine Pan-Dermatophyten-PCR durchgeführt wird, können Dermatophyten als Erreger nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Über diese Eigenschaft verfügt von den hier beschriebenen Methoden nur das MycoDerm Kit.

Außerdem sind Mikroskopie und Kultur sehr ungerichtete Untersuchungsverfahren. Das bedeutet, dass auch initial nicht in Erwägung gezogene Differentialdiagnosen wie Schimmelpilze, Hefen oder Bakterien nachgewiesen werden.

Nicht zuletzt haben die konventionellen Methoden vor allem deshalb ihre Daseinsberechtigung, weil in Deutschland bislang nur diese mit den Krankenkassen abgerechnet werden können. Eine PCR-Analyse für Dermatomykosen ist zur Zeit noch eine sogenannte „Individuelle Gesundheitsleistung“ (kurz: IGeL) und muss vom Patienten selbst bezahlt werden. Auch daher wird die PCR in diesem Bereich wohl vorerst nur eine Ergänzung der Diagnostik darstellen. Es bleibt aber anzumerken, dass weder die herkömmliche Diagnostik noch die molekularen Methoden eine Unterscheidung zwischen wirklicher Infektion und harmloser transienter Besiedelung machen können.

9 Zusammenfassung

Dermatomykosen sind weit verbreitete Erkrankungen mit weltweit steigender Prävalenz. Das klinische Spektrum umfasst u.a. Tinea corporis, capitis und pedis sowie Onychomykose. Die herkömmliche Diagnostik mittels Nativ-Mikroskopie und Kultur ist wenig sensitiv und spezifisch, außerdem sehr langwierig. In den letzten Jahren sind verschiedene molekulare Methoden entwickelt worden und einige wenige sogar kommerziell erhältlich. Ziel dieser Arbeit war es, drei dieser PCR-basierten Nachweis-Methoden zu vergleichen. Kriterien waren hierbei vor allem Sensitivität und Spezifität, aber auch Praktikabilität, Automatisierungs-Möglichkeiten, erforderliche Ausstattung und Kosten. Wir testeten 323 klinische Proben, die zur Routinediagnostik eingesandt wurden, mit einer In-house Methode, die von Bergmans et al. publiziert wurde, und zwei kommerziell erhältlichen Kits: FTD Dermatophytes Kit von Fast Track Diagnostics und Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow von Biotype Diagnostic GmbH. Außerdem wurde die herkömmliche Diagnostik mit Mikroskopie und Kultur durchgeführt.

Das FTD Kit hatte die höchste Sensitivität, alle drei molekularen Methoden waren hoch spezifisch. Die In-house Methode ist günstig und zeitsparend. Außerdem wird durch das Prinzip der Real-time PCR das Kontaminations-Risiko gesenkt. Nachteile sind die Komplexität und die Notwendigkeit eines teuren LightCyclers®. Das FTD Kit hat mehrere Vorteile: Eine niedrige Hands-on time, niedrige Kosten und eine einfache Handhabung. Außerdem liegt auch hier eine Real-time PCR vor, mit den oben genannten Vorteilen. Aber auch hier benötigt man einen LightCycler®. Das MycoDerm Kit hat die höchsten Kosten und Hands-on time und das Kontaminations-Risiko ist höher. Aber es ist einfach durchzuführen und braucht nur einen Thermocycler. Seine herausragenden Merkmale sind die Stufendiagnostik und die Möglichkeit, auch die wichtigsten Hefen und Schimmelpilze zu erfassen.

Die molekularen Methoden werden vermutlich die herkömmliche Diagnostik in naher Zukunft nicht ganz verdrängen. Allerdings stellen diese neuen Tests eine sehr gute Ergänzung für den diagnostischen Algorithmus der Dermatomykosen dar und sollten mehr genutzt werden. Beim Auswahlprozess einer geeigneten Methode zur Etablierung in einem Routine-Labor werden viele Fragen aufgeworfen und diese Arbeit soll einen Überblick für diese drei Methoden geben.

10 Literaturverzeichnis

1. Hof H. Mykologie für Mediziner: Grundlagen, Pathogenese, Manifestationen, Diagnostik, Therapie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003.
2. Hof H, Dörries R, Herausgeber. Medizinische Mikrobiologie [Internet]. 5. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014 [zitiert 12. Juli 2016]. Verfügbar unter: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-002-95264>
3. Mügge C, Haustein U-F, Nenoff P. Causative agents of onychomycosis — a retrospective study. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges.* 2006;4(3):218–28.
4. Gupta AK, Gupta G, Jain HC, Lynde CW, Foley KA, Daigle D, Cooper EA, Summerbell RC. The prevalence of unsuspected onychomycosis and its causative organisms in a multicentre Canadian sample of 30 000 patients visiting physicians' offices. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1. September 2016;30(9):1567–72.
5. Wlodek C, Trickey A, Berker D de, Johnson EM. Trends in laboratory-diagnosed onychomycosis between 2006 and 2014 in the South West of England. *Br J Dermatol.* 2017;176(1):237–40.
6. Drakensjö IT, Chryssanthou E. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005–2009. *Med Mycol.* 1. Juli 2011;49(5):484–8.
7. Seebacher C. Leitlinie AWMF Tinea der freien Haut 13-002. 2008;
8. Kupsch C, Berlin M, Gräser Y. Dermatophyten und Meerschweinchen. *Hautarzt.* 14. Juni 2017;1–4.
9. Hay RJ. Tinea Capitis: Current Status. *Mycopathologia.* 1. Februar 2017;182(1–2):87–93.
10. Fari E, Gräser Y, Presber, Tietz. An epidemic of tinea corporis caused by *Trichophyton tonsurans* among children (wrestlers) in Germany. *Mycoses.* 2000;43(5–6):191–6.
11. Ilkit M, Ali Saracli M, Kurdak H, Turac-Bicer A, Yuksel T, Karakas M, Schuenemann E, Abdel-Rahman SM. Clonal outbreak of *Trichophyton tonsurans* tinea capitis gladiatorum among wrestlers in Adana, Turkey. *Med Mycol.* 1. Mai 2010;48(3):480–5.
12. White JML, Higgins EM, Fuller LC. Screening for asymptomatic carriage of *Trichophyton tonsurans* in household contacts of patients with tinea capitis: results of 209 patients from South London. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007;21(8):1061–4.
13. Sigurgeirsson B, Baran R. The prevalence of onychomycosis in the global population – A literature study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1. November 2014;28(11):1480–91.
14. Robson J. Focus on dermatophytes. Sullivan Nicolaidis Pty Ltd. 2013;

15. Szepietowski JC, Reich A, Garlowska E, Kulig M, Baran E. Factors Influencing Coexistence of Toenail Onychomycosis With Tinea Pedis and Other Dermatomycoses: A Survey of 2761 Patients. *Arch Dermatol*. 1. Oktober 2006;142(10):1279–84.
16. Elewski BE. Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *Clin Microbiol Rev*. Juli 1998;11(3):415–29.
17. Nenoff P, Ginter-Hanselmayer G, Tietz H-J. Onychomykose – ein Update. *Hautarzt*. 2012;63(1):30–8.
18. Nenoff P, Krüger C, Schaller J, Ginter-Hanselmayer G, Schulte-Beerbühl R, Tietz H-J. Mycology – an update Part 2: Dermatomycoses: Clinical picture and diagnostics. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges*. 1. September 2014;12(9):749–77.
19. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008;51(s4):2–15.
20. Burzykowski T, Molenberghs G, Abeck D, Haneke E, Hay R, Katsambas A, Roseeuw D, Kerkhof PVD, Aelst RV, Marynissen G. High prevalence of foot diseases in Europe: results of the Achilles Project. *Mycoses*. 2003;46(11–12):496–505.
21. Elewski BE. Diagnostic techniques for confirming onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*. 1. September 1996;35(3, Part 2):S6–9.
22. Scher RK. Onychomycosis: A significant medical disorder. *J Am Acad Dermatol*. 1. September 1996;35(3, Part 2):S2–5.
23. Ghannoum M, Isham N. Fungal Nail Infections (Onychomycosis): A Never-Ending Story? *PLOS Pathog*. 5. Juni 2014;10(6):e1004105.
24. Augustin M, Herberger K, Hintzen S, Heigel H, Franzke N, Schäfer I. Prevalence of skin lesions and need for treatment in a cohort of 90 880 workers. *Br J Dermatol*. 2011;165(4):865–73.
25. Bombace F, Iovene MR, Galdiero M, Martora F, Nicoletti GF, D'Andrea M, Della Pepa ME, Vitiello M. Non-dermatophytic onychomycosis diagnostic criteria: an unresolved question. *Mycoses*. 8. April 2016;
26. Tchernev G, Penev PK, Nenoff P, Zisova LG, Cardoso JC, Taneva T, Ginter-Hanselmayer G, Ananiev J, Gulubova M, Hristova R, Nocheva D, Guarneri C, Martino G, Kanazawa N. Onychomycosis: modern diagnostic and treatment approaches. *Wien Med Wochenschr*. 30. September 2012;163(1–2):1–12.
27. Zaias N, Tosti A, Rebell G, Morelli R, Bardazzi F, Bielek H, Zaiac M, Glick B, Paley B, Allevalo M, Baran R. Autosomal dominant pattern of distal subungual onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*. *J Am Acad Dermatol*. 1. Februar 1996;34(2, Part 1):302–4.
28. Buder V, Augustin M, Schäfer I, Welsch G, Catala-Lehnen P, Herberger K. Prävalenz von Dermatomykosen bei Profifußballspielern. *Hautarzt*. 1. Mai 2018;69(5):401–7.

29. Mayser P, Handrick W, Nenoff P. Sportassoziierte Dermatophytosen. *Hautarzt*. 6. Juli 2016;1–8.
30. Gupta AK, Daigle D, Foley KA. The prevalence of culture-confirmed toenail onychomycosis in at-risk patient populations. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1. Juni 2015;29(6):1039–44.
31. Roujeau J-C, Sigurgeirsson B, Kortling H-C, Kerl H, Paul C. Chronic Dermatomycoses of the Foot as Risk Factors for Acute Bacterial Cellulitis of the Leg: A Case-Control Study. *Dermatology*. 2004;209(4):301–7.
32. Fukunaga A, Washio K, Ogura K, Taguchi K, Chiyomaru K, Ohno Y, Masaki T, Nagai H, Nagano T, Oka M, Nishigori C. Onychomycosis as a Warning Sign for Peripheral Arterial Disease. *Acta Derm Venereol*. 2013;93(6):747–8.
33. Katsambas A, Abeck D, Haneke E, Kerkhof PVD, Burzykowski T, Molenberghs G, Marynissen G. The effects of foot disease on quality of life: results of the Achilles Project. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2004;19(2):191–5.
34. Thomas J, Jacobson GA, Narkowicz CK, Peterson GM, Burnet H, Sharpe C. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *J Clin Pharm Ther*. 2010;35(5):497–519.
35. Drake LA, Dinehart SM, Farmer ER, Goltz RW, Graham GF, Hordinsky MK, Lewis CW, Pariser DM, Skouge JW, Webster SB, Whitaker DC, Butler B, Lower BJ, Elewski BE, Elgart ML, Jacobs PH, Leshner JL, Scher RK. Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin: Tinea corporis, tinea cruris, tinea faciei, tinea manuum, and tinea pedis. *J Am Acad Dermatol*. 1. Februar 1996;34(2, Part 1):282–6.
36. Sahoo AK, Mahajan R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian Dermatol Online J*. 3. Januar 2016;7(2):77.
37. Vermout S, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B. Pathogenesis of Dermatophytosis. *Mycopathologia*. 1. November 2008;166(5–6):267.
38. Borgers M, Cauwenbergh HD and G. Fungal Infections of the Skin: Infection Process and Antimycotic Therapy [Internet]. *Current Drug Targets*. 2005 [zitiert 12. Juni 2018]. Verfügbar unter: <http://www.eurekaselect.com/60452/article>
39. Gupta AK, Cooper EA. Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. *Mycopathologia*. 1. November 2008;166(5–6):353–67.
40. Nenoff P, Krüger C, Paasch U, Ginter-Hanselmayer G. Mycology – an update Part 3: Dermatomycoses: topical and systemic therapy. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges*. 1. Mai 2015;13(5):387–411.
41. Wiegand C, Bauer A, Brasch J, Nenoff P, Schaller M, Mayser P, Hipler U-C, Elsner P. Are the classic diagnostic methods in mycology still state of the art? *JDDG J Dtsch Dermatol Ges*. 1. Mai 2016;14(5):490–4.
42. Ghannoum M, Isham N, Catalano V. A second look at efficacy criteria for onychomycosis: clinical and mycological cure. *Br J Dermatol*. 2014;170(1):182–7.

43. Scher RK, Tavakkol A, Sigurgeirsson B, Hay RJ, Joseph WS, Tosti A, Fleckman P, Ghannoum M, Armstrong DG, Markinson BC, Elewski BE. Onychomycosis: Diagnosis and definition of cure. *J Am Acad Dermatol*. Juni 2007;56(6):939–44.
44. Robert R, Pihet M. Conventional Methods for the Diagnosis of Dermatophytosis. *Mycopathologia*. 1. November 2008;166(5–6):295–306.
45. Lilly KK, Koshnick RL, Grill JP, Khalil ZM, Nelson DB, Warshaw EM. Cost-effectiveness of diagnostic tests for toenail onychomycosis: A repeated-measure, single-blinded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests. *J Am Acad Dermatol*. 1. Oktober 2006;55(4):620–6.
46. Suh D-C, Friedlander SF, Raut M, Chang J, Vo L, Shin H-C, Tavakkol A. Tinea capitis in the United States: Diagnosis, treatment, and costs. *J Am Acad Dermatol*. 1. Dezember 2006;55(6):1111–2.
47. Effendy I, Lecha M, Chauvin MF de, Chiacchio ND, Baran R. Epidemiology and clinical classification of onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19(s1):8–12.
48. Petinataud D, Berger S, Contet-Audonneau N, Machouart M. Molecular diagnosis of onychomycosis. *J Mycol Medecale*. Dezember 2014;24(4):287–95.
49. Pihet M, Govic YL. Reappraisal of Conventional Diagnosis for Dermatophytes. *Mycopathologia*. 1. Februar 2017;182(1–2):169–80.
50. Seebacher C, Brasch J, Abeck D, Cornely O, Effendy I, Ginter-Hanselmayer G, Haake N, Hamm G, Hipler U-C, Hof H, Korting HC, Mayser P, Ruhnke M, Schlacke K-H, Tietz H-J. Onychomycosis. *Mycoses*. 1. Juli 2007;50(4):321–7.
51. Chauvin MF de. New diagnostic techniques. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19(s1):20–4.
52. Schroeder J, Schaffrinski M, Rüchel R. Optische Aufheller in der Pilzdiagnostik. *Mycoses*. 1. November 2006;49:14–7.
53. Hamer EC, Moore CB, Denning DW. Comparison of two fluorescent whiteners, Calcofluor and Blankophor, for the detection of fungal elements in clinical specimens in the diagnostic laboratory. *Clin Microbiol Infect*. 1. Februar 2006;12(2):181–4.
54. Ovrén E, Berglund L, Nordlind K, Rollman O. Dermatophytosis: fluorostaining enhances speed and sensitivity in direct microscopy of skin, nail and hair specimens from dermatology outpatients. *Mycoses*. 2016;59(7):436–41.
55. Pihet M, Clément N, Kauffmann-Lacroix C, Nail-Billaud S, Marot A, Pilon F, Robert R. Diagnosis of dermatophytosis: an evaluation of direct examination using MycetColor® and MycetFluo®. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1. Oktober 2015;83(2):170–4.
56. Ghannoum M, Mukherjee P, Isham N, Markinson B, Rosso JD, Leal L. Examining the importance of laboratory and diagnostic testing when treating and diagnosing onychomycosis. *Int J Dermatol*. 2018;57(2):131–8.

57. Gräser Y, Czaika V, Ohst T. Diagnostic PCR of dermatophytes – an overview. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges.* 1. Oktober 2012;10(10):721–5.
58. Verrier J, Monod M. Diagnosis of Dermatophytosis Using Molecular Biology. *Mycopathologia.* 1. Februar 2017;182(1–2):193–202.
59. Velasquez-Agudelo V, Cardona-Arias JA. Meta-analysis of the utility of culture, biopsy, and direct KOH examination for the diagnosis of onychomycosis. *BMC Infect Dis* [Internet]. 22. Februar 2017;17. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5320683/>
60. da Cunha KC, Riat A, Normand A-C, Bosshard PP, de Almeida MTG, Piarroux R, Schrenzel J, Fontao L. Fast identification of dermatophytes by MALDI-TOF/MS using direct transfer of fungal cells on ground steel target plates. *Mycoses.* 15. Mai 2018;
61. L'Ollivier C, Ranque S. MALDI-TOF-Based Dermatophyte Identification. *Mycopathologia.* 1. Februar 2017;182(1–2):183–92.
62. Nenoff P, Erhard M, Simon JC, Muylowa GK, Herrmann J, Rataj W, Gräser Y. MALDI-TOF mass spectrometry – a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med Mycol.* 1. Januar 2013;51(1):17–24.
63. Higashi Y, Miyoshi H, Takeda K, Saruwatari H, Kubo H, Sakaguchi I, Iwata M, Uchida Y, Tada K, Miyamoto M, Wakamoto H, Takasaki S, Ishida H, Noriki S, Kanekura T. Evaluation of a newly-developed immunochromatography strip test for diagnosing dermatophytosis. *Int J Dermatol.* 2012;51(4):406–9.
64. Noriki S, Ishida H. Production of an anti-dermatophyte monoclonal antibody and its application: immunochromatographic detection of dermatophytes. *Med Mycol.* November 2016;54(8):808–15.
65. Jensen RH, Arendrup MC. Molecular diagnosis of dermatophyte infections: *Curr Opin Infect Dis.* April 2012;25(2):126–34.
66. Verrier J, Pronina M, Peter C, Bontems O, Fratti M, Salamin K, Schürch S, Gindro K, Wolfender J-L, Harshman K, Monod M. Identification of Infectious Agents in Onychomycoses by PCR-Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism. *J Clin Microbiol.* 3. Januar 2012;50(3):553–61.
67. Heidemann S, Monod M, Gräser Y. 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.* 2010;162(2):282–95.
68. Mochizuki T, Takeda K, Anzawa K. Molecular Markers Useful for Intraspecies Subtyping and Strain Differentiation of Dermatophytes. *Mycopathologia.* 1. Februar 2017;182(1–2):57–65.
69. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Dillen PMW, Noordaa J van der. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* März 1990;28(3):495.

70. Dingermann T, Winckler T, Zündorf I, Mahler H-C. *Gentechnik, Biotechnik: Grundlagen und Wirkstoffe ; mit 111 Tabellen. 2., völlig neu bearb. und erw. Aufl.* Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 2011. 963 S.
71. Caplin BE. *LightCycler™ Hybridization Probes - The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection.* 1999;
72. Bergmans AMC, van der Ent M, Klaassen A, Böhm N, Andriessse GI, Wintermans RGF. Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. *Clin Microbiol Infect.* Juni 2010;16(6):704–10.
73. Mehlig L, Garve C, Ritschel A, Zeiler A, Brabetz W, Weber C, Bauer A. Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses.* 1. Januar 2014;57(1):27–34.
74. Hess AS, Shardell M, Johnson JK, Thom KA, Strassle P, Netzer G, Harris AD. Methods and recommendations for evaluating and reporting a new diagnostic test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* September 2012;31(9):2111–6.
75. Petinataud D, Berger S, Ferdynus C, Debourgogne A, Contet-Audonneau N, Machouart M. Optimising the diagnostic strategy for onychomycosis from sample collection to FUNGAL identification evaluation of a diagnostic kit for real-time PCR. *Mycoses.* 1. Mai 2016;59(5):304–11.
76. Summerbell RC, Cooper E, Bunn U, Jamieson F, Gupta AK. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. *Med Mycol.* 1. Februar 2005;43(1):39–59.
77. INSTAND e.V. - Ringversuche Service [Internet]. [zitiert 17. September 2018]. Verfügbar unter:
https://www.instand-ev.de/no_cache/ringversuche-online/ringversuche-service/#rvp//491/-2015/
78. INSTAND e.V. - Ringversuche Service [Internet]. [zitiert 17. September 2018]. Verfügbar unter:
https://www.instand-ev.de/no_cache/ringversuche-online/ringversuche-service/#rvp//490/-2015/
79. Nenoff P, Herrmann J, Gräser Y. Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges.* 1. März 2007;5(3):198–202.
80. Reischl U, Drosten C, Moter A, von Müller L, Geißdörfer W, Rabenau HF, Reiter-Owona I, Hoffmann KS, Weitz M, Meyer T, Roth A, Panning M. *MiQ 01: Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT).* 3. Auflage. Bd. Heft 1. Urban & Fischer Verlag in Elsevier; 2011.
81. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. *The MIQE Guidelines:*

Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.
Clin Chem. 1. April 2009;55(4):611–22.

82. Prinzip – TIB MOLBIOL [Internet]. [zitiert 24. März 2020]. Verfügbar unter: <https://tib-molbiol.com/de/lightcycler/principle/index.html>

11 Publikation

Poster:

Vera Bußmann, Ana-Gabriela Sitaru, Klaus Panthel, Cassian Sitaru (2018)
Evaluation of PCR-based tests for fungal identification in dermatomycoses. 52.
*Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.
V. gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Medizinische Mykologie,
Innsbruck, 6.- 8.9.2018.*

12 Lebenslauf

Die Seite 72 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten.
Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

Die Seite 73 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten.
Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

13 Eidesstattliche Versicherung

Anlage 2

Zum Antrag auf Zulassung zur Promotion

Zum Dr. med.
(med. / med.dent.)

Bußmann, Vera

(Name) (Vorname)

Eidesstattliche Versicherung

gemäß § 8 Absatz 1 Nr. 3 der Promotionsordnung der Universität Freiburg für die Medizinische Fakultät

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema
Molekulare Methoden zum Erreger-Nachweis bei Dermatomykosen

_____ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
3. Die Ordnung der Albert-Ludwigs-Universität zur Sicherung der Redlichkeit in der Wissenschaft habe ich zur Kenntnis genommen und akzeptiert
4. Die Dissertation oder Teile davon habe ich
(Zutreffendes bitte ankreuzen)

bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

wie folgt an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt:

Titel der andernorts vorgelegten Arbeit:

Name der betreffenden Hochschule:

Jahr der Vorlage der Arbeit:

Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung:

5. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
6. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Freiburg, 26.07.2020

Ort und Datum



Unterschrift

14 Danksagung

Vielen Dank

- Herrn Prof. Dr. med. Cassian Sitaru für die Überlassung und Betreuung des Dissertationsthemas, die vielfältige Unterstützung, Geduld und Zeit.
- Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Leena Bruckner-Tuderman für die Möglichkeit, an der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Freiburg zu promovieren.
- Frau Dr. med. Ana-Gabriela Sitaru und Herrn Dr. rer. nat. Klaus Panthel vom MVZ Clotten für die tatkräftige Unterstützung und das zur Verfügung stellen von Zeit und Ressourcen.
- dem Team des Pilzlabors der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Freiburg fürs engagierte Proben sammeln.
- dem Team des Pilzlabors des MVZ Clotten für die tatkräftige und geduldige Unterstützung
- meiner „alten Abteilung“, der Molekularbiologie des MVZ Clotten, für's Auftauen, Einfrieren, Einschalten, Ausschalten usw. Und für die unendliche Geduld, wenn ich wieder einen Cyclus belegt hatte oder sonst wie ausgebremst habe. Vor allem aber für die moralische Unterstützung durch liebe und aufmunternde Worte und das Gefühl (zumindest ein bisschen) wieder dabei zu sein. Ihr seid die besten KollegInnen!
- Mein tiefster Dank gilt allerdings meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben, meinen Traum zu verwirklichen (vor allem meiner Mutter, unter anderem fürs Korrektur-Lesen). Und natürlich Stefan Max Huber, dem geduldigsten Partner, den man haben kann, und eine große Hilfe bei Technik-Tourette!