Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Plewig
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. Ruzicka

Etablierung einer molekularen Sofortdiagnostik von Dermatophyten auf Speziesebene aus nativem Material von Patienten mit Hautmykosen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Real-time PCR (LightCycler)

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Barbara Beifuß
aus
München
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. C. Korting
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Frank Ebel
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. T. Igo-Kemenes
	Priv. Doz. Dr. Y. Gräser
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	10.07.2008

Meinen Eltern und
meiner Schwester

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

1.1 Dermatophyten 2

1.1.1 Taxonomische Stellung 2

1.1.2 Klinische Bedeutung 4

1.1.3 Virulenzfaktoren 7

1.1.4 Diagnostik 7

1.1.5 Therapeutische Optionen 11

1.2 Entwicklung molekularer DNA-Analytik 14

1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion 14

1.2.2 Real-time PCR 16

1.3 Zielsetzung der Arbeit 17

2. MATERIAL UND METHODEN 18

2.1 Material 18

2.1.1 Geräte 18

2.1.2 Datenbanken 18

2.1.3 Software 19

2.1.4 Verbrauchsmaterialien 19

2.1.5 Reagenzien 20

2.1.6 Pilzstämme 21

2.1.7 Patientenkollektiv 23

2.2 Methoden 24

2.2.1 Konventionelle Diagnostik der Pilzkulturen 24

2.2.2 DNA-Isolierung 27

2.2.3 Polymerasekettenreaktion 28

2.2.4 Identifizierung der PCR-Produkte 33

2.2.5 Real-time PCR am LightCycler 35

2.2.6 Sequenzierung 38

2.2.7 Statistische Auswertung und benutzte Software 38

3. ERGEBNISSE 39

3.1 Methoden-Evaluierung 39

3.1.1 Etablierung eines DNA-Extraktionsverfahrens 39

3.1.2 Charakterisierung der Dermatophyten mittels PCR am Thermocycler 40

3.1.3 Etablierung der PCR-ELISA-Technik 43

3.1.4 Etablierung der LC-Technik 46

3.2 Oligozentrische Studie: Ergebnisse 55

3.2.1 München 55

3.2.2 Tübingen 56

3.2.3 Neu-Ulm 56

3.2.4 Vergleich der Methoden 57

3.2.5 Vergleich der Entnahmestellen 59

3.2.6 Vergleich der Probenmenge 60

3.2.7 Real-time PCR 62

3.3 Kosten 63

4. DISKUSSION 66

4.1 Methoden-Etablierung 67

4.1.1 DNA-Extraktionsverfahren 67

4.1.2 PCR-Techniken 68

4.2 Oligozentrische Studie 78

4.2.1 PCR-ELISA 78

4.2.2 Real-time PCR 81

5. ZUSAMMENFASSUNG 82

6. LITERATURVERZEICHNIS 84

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 94

8. DANKSAGUNG 96

9. LEBENSLAUF 98

1. EINLEITUNG

Der Ursprung der Mykologie lässt sich bis in das 17. Jahrhundert zurückverfolgen, als Hook 1676 in der „Gelbfleckenkrankheit“ von Rosenblättern erstmals filamentöse Organismen entdeckte (88). Lange vor der medizinischen Bakteriologie datiert der Beginn der medizinischen Mykolgie im Jahre 1839: Johann L. Schönlein (1793-1864) beschrieb in einer 23-zeiligen Mitteilung die „Pilz-Natur“ des Favuserregers, sein Schüler Robert Remak (1815-1865) erbrachte schließlich 1842 in einem Inokulationsversuch an sich selbst den wissenschaftlichen Nachweis der Pilzätiologie des Favus und benannte den Erreger nach seinem Mentor *Achorion schoenleinii*.

David Gruby (1810-1898) gilt aufgrund seiner Entdeckungen zwischen 1841 und 1844 als Begründer der Dermatomykologie: Unabhängig von den Arbeiten Remaks und Schönleins isolierte Gruby den Erreger des Favus und wies 1841 zum ersten Mal den pathogenetischen Zusammenhang zwischen Erreger und bisher ätiologisch ungeklärten Krankheitsbildern nach (44, 45). Ferner gelang ihm 1843 die Erstbeschreibung von *Microsporum audouinii* (46).

Weitere bahnbrechende Arbeit leistete Raymond Sabouraud (1864-1938) für die Mykologie, indem er wichtige Beschreibungen zu Taxonomie und Morphologie der Dermatophyten vornahm, sowie verbesserte und standardisierte Nährboden, unter anderem den noch heute gebräuchlichen Sabouraud-Glucose-Agar, einführte.

Chester Emmons (1900-1985) modernisierte 1934 die von Sabouraud aufgestellte Taxonomie und reduzierte die Anzahl der Dermatophyten-Gattungen auf *Epidermophyton*, *Microsporum* und *Trichophyton*. Eine weitere Reduktion auf Spezies-Ebene gelang Libero Ajello und Lucille K. Georg, auch wurden Möglichkeiten für eine vereinfachte Identifizierung von Dermatophyten sowie neue Kulturverfahren entwickelt.

Die Entdeckung der perfekten Formen (Teleomorphe) einiger Dermatophyten-Spezies durch Dawson und Gentles 1959 (25) eröffnete neue Möglichkeiten der Differenzierung durch Kreuzungsversuche.

Ein historischer Schritt in der Mykologie war die Isolierung des ersten antimykotischen Wirkstoffes Griseofulvin 1939 durch Oxford et al. (99). Allerdings konnte die Wirksamkeit in vivo erst 1958 an Meerschweinchen nachgewiesen werden (37). Weitere Antimykotika wie Nystatin (1950) (53) und Amphotericin B (1955/1956) (27, 38) folgten und leiteten wichtige Fortschritte in der systemischen und topischen Therapie von Mykosen ein, die bis heute vor großen Herausforderungen steht und auch zukünftig auf Neuentwicklungen angewiesen ist.

Dermatophyten

Taxonomische Stellung

Pilze (Fungi) bilden neben den Monera, Pflanzen, Protisten und Tieren ein eigenständiges Reich. Als Eukaryonten besitzen sie mindestens einen echten Zellkern und ein Cytoskelett, sind jedoch nicht zur Photosynthese fähig und deshalb auf einen kohlenstoffheterotrophen Stoffwechsel angewiesen. Die Zellwand kann aus Cellulose, Chitin, Proteinen, Glucan- und Mannanpolymeren bestehen, als Nährstoffspeicher dient hingegen wie im Tierreich Glykogen.

Die als „Unechte Pilze“ bezeichneten Myxomyzeten (Schleimpilze) und die cellulosehaltigen Falschen Mehltaupilze (Oomyzeten) werden heute von den Echten Pilzen (Eumyzeten) abgegrenzt.

Eine Einordnung der Eumyzeten in das phylogenetische System erfolgt nach morphologischen Kriterien ihrer geschlechtlichen Vermehrungsformen (Teleomorphe) in fünf Abteilungen (57):

- Jochpilze (Zygomycota)
- Töpfchenpilze (Chytridiomycota)
- Schlauchpilze (Ascomycota)
- Ständerpilze (Basidiomycota)
- Fungi imperfecti (Deuteromycota)

Die heterogene Gruppe der Deuteromyzeten stellt jedoch ein künstliches Formtaxon dar: Bei vielen Pilzen ist aufgrund der fehlenden Geschlechtsform streng genommen keine exakte botanische Klassifizierung möglich, so dass diese Pilze nach ihren ungeschlechtlichen, vegetativen Vermehrungsformen (Anamorphe) benannt und in die Gruppe der Fungi imperfecti eingeteilt werden. In dieser Gruppe finden sich vor allem Pilze mit humanpathogener Bedeutung, wie die Dermatophyten-Gattungen *Epidermophyton*, *Microsporum* und *Trichophyton*, die asporogenen Hefen der Gattungen *Candida*, *Cryptococcus*, *Pityrosporum*, *Rhodotorula* und *Trichosporon*, sowie die Schimmelpilz-Gattungen *Aspergilllus* und *Scopulariopsis*.

Bei 23 Dermatophytenspezies sind perfekte Formen durch Kreuzungsversuche gefunden worden (11 *Trichophyton*- und 12 *Microsporum*-Spezies) (56). Ihre sexuellen Sporen werden nach Kreuzung von zwei Stämmen einer Art mit unterschiedlichem Paarungstyp (in der Regel als + und - bezeichnet) innerhalb der Gymnothecien in sogenannten Asci, schlauchartigen Gebilden, produziert und daher als Ascosporen bezeichnet. Nach heutiger Auffassung zählen

die teleomorphen Formen der Dermatophyten zu den Ascomyzeten, die in der medizinischen Mykologie weitaus häufigeren anamorphen Formen mit ihren vegetativen Vermehrungseinheiten (Konidien) hingegen zu den Deuteromyceten (Tabelle 1).

	Anamorphe	**Teleomorphe**
Reich	Fungi	Fungi
Abteilung	Ascomycota	Ascomycota
Klasse	Deuteromycetes	Euascomycetes
Ordnung	Onygenales	Onygenales
Familie	Arthrodermataceae	Arthrodermataceae
Gattung	*Trichophyton*	*Arthroderma*
Art (Spezies)	*tonsurans*	*benhamiae*

Tabelle 1: Taxonomische Einteilung am Beispiel *Trichophyton tonsurans*/*Arthroderma benhamiae*

In der medizinischen Mykologie hat sich die korrekte botanische Einteilung der Pilze oft als wenig geeignet erwiesen, weshalb eine vereinfachte Unterteilung nach dem DHS-System (nach Rieth) (104) vorgenommen wurde in

Dermatophyten
Hefen
Schimmelpilze.

Dermatophyten zählen zu den keratinophilen Fadenpilzen, die den Gattungen *Trichophyton*, *Microsporum* und *Epidermophyton* angehören. Für *Trichophyton* und *Microsporum* sind sowohl anamorphe als auch teleomorphe Formen bekannt, von *Epidermophyton* konnte bislang keine perfekte Form isoliert werden.

Klinische Bedeutung

Das Reservoir der Dermatophyten umfasst anthropophile, zoophile und geophile Habitate (Tabelle 2). Anthropophile Arten haben eine in der Regel deutlich höhere Kontagiosität beim Menschen als zoophile oder geophile Arten, allerdings rufen Infektionen mit zoophilen und geophilen Dermatophyten in der Regel stärker entzündliche Reaktionen hervor (57).

Gattung	**Habitat**		
	anthropophil	**zoophil**	**geophil**
Trichophyton	*T. rubrum*	*T. verrucosum*	*T. terrestre*
	T. interdigitale	*T. mentagrophytes*	
	T. tonsurans		
	T. violaceum		
	T. soudanense		
	T. schoenleinii		
Microsporum	*M. audouinii*	*M. canis*	*M. gypseum*
	M. ferrugineum		
Epidermophyton	*E. floccosum*		

Tabelle 2: Wichtige Dermatophyten und ihre Herkunft

Mykosen der Haut und hautnahen Schleimhäute gehören weltweit zu den häufigsten Infektionskrankheiten. Allein die Prävalenz einer Onychomykose wird in Deutschland auf 12,4 % (1), die einer Tinea pedis sogar auf etwa 30 % geschätzt (120). Hautmykosen können nicht mehr nur als rein „kosmetisches Problem“ verstanden werden: Neben einer Beeinträchtigung der Lebensqualität der betroffenen Patienten muss die zentrale Gefahr für das Entstehen von Folgeerkrankungen gesehen werden (76): Mykotische Hautläsionen, insbesondere die Tinea pedis, dienen als Eintrittspforte für pathogene Bakterien, wie etwa *Streptococcus pyogenes*, und können unter Umständen lebensbedrohliche Erysipele auslösen (112).

Humanpathogene keratinophile Dermatophyten befallen Haut, Haare und Nägel. Hierbei werden zwei Pathomechanismen unterschieden: Obligat pathogene Erreger, zu denen die zoophilen Dermatophytenarten gezählt werden, können auf anatomisch und funktionell gesundem Gewebe primäre Mykosen hervorrufen. Fakultativ pathogene Erreger hingegen verursachen sekundäre Mykosen, wie sie bei den meisten Infektionen durch *T. rubrum* vorliegen. Hierbei befällt der Erreger abwehrgeschwächte oder funktionell beeinträchtigte Haut bzw. deren Anhangsorgane. Zu den Risikofaktoren, die das Entstehen von Mykosen

begünstigen, zählen neben endogenen Faktoren wie Thermoregulationstörungen, einer gestörten Mikroflora nach Einsatz von Immunsuppressiva oder Antibiotika, Fußfehlstellungen, Traumen, peripheren Durchblutungsstörungen und Diabetes mellitus auch exogene Faktoren, zu denen milieu- oder kleidungsbedingte Feuchtigkeits- und Wärmestauungen, aber auch der dauerhafte Kontakt mit Chemikalien zählen (57, 76).

Die klinische Manifestation einer Dermatomykose hängt vom Ort der Infektion ab. Unter einer „Tinea“ wird eine „durch Dermatophyten bedingte entzündliche Hauterkrankung mit Beteiligung unterschiedlicher Anteile des Hautorgans einschließlich der Nägel“ verstanden (121). Je nach Lokalisation wird eine leitlinienkonforme Einteilung in Tinea pedis, Tinea manuum, Tinea inguinalis, Tinea corporis et faciei, Tinea unguium oder Tinea capitis vorgenommen.

Die Tinea pedis ist die häufigste durch Dermatophyten verursachte Mykose, gekennzeichnet durch eine Infektion der Fußsohlen und/oder intertriginöser Zehenzwischenräume. Häufigster Erreger ist *T. rubrum*, gefolgt von *T. interdigitale*, seltener kommen andere Dermatophyten vor (121).

Klinisch werden drei Erscheinungsformen unterschieden:

- Interdigitale Form
- Squamös-hyperkeratotische Form
- Vesikulös-dishydrotische Form.

Auch die Tinea manuum wird als oberflächliche akute oder chronische Mykose einer oder beider Hände überwiegend von *T. rubrum* verursacht. Analog zur Tinea pedis sind hier ebenfalls Haut-Schädigungen als Eintrittspforte für die Pilz-Erreger anzusehen. Häufig liegt eine Übertragung der Mykose durch infizierte Fußhaut oder Fußnägel zugrunde.

Haupterreger einer Tinea inguinalis, einer entzündlichen Dermatophyteninfektion der Inguinalregion, stellen *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* und *E. floccosum* dar.

Als Dermatophytose der lanugobehaarten Haut einschließlich des Gesichts ist die Tinea corporis et faciei definiert. Bei Infektionen mit anthropophilen Dermatophyten, wie *T. rubrum*, *T. tonsurans* oder *E. floccosum*, sind in der Regel nur die oberen Abschnitte des Haarfollikels betroffen und die entzündliche Reaktion verläuft moderater als beim Befall mit zoophilen Dermatophyten. Insbesondere *T. mentagrophytes* und *M. canis* werden von Tieren auf den Menschen übertragen.

M. canis ist derzeit der häufigste Erreger einer Tinea capitis in Mitteleuropa (129). Oftmals sind Katzen und Meerschweinchen als Infektionsquellen auszumachen. Die Tinea capitis ist eine Mykose der behaarten Kopfhaut, wobei das klinische Bild sehr vielgestaltig sein kann: Ektotriche Infektionsformen werden durch *M. canis, M. audouinii* und *T. mentagrophytes* var. *granulosum,* endotriche Formen von *T. verrucosum, T. tonsurans* und *T. violaceum* verursacht.

Differenziert ist die Tinea unguium zu betrachten: Sie weist keine Selbstheilungstendenz auf und kann als chronische Pilzinfektion der Finger- und/oder Zehennägel zum Ausgangspunkt weiterer Mykoseherde der Haut werden, weshalb das Ziel jeder aufwändigen Behandlung klinisch gesunde Nägel, vor allem aber deren Pilzfreiheit sein muss.

Häufigster Erreger mit 84 % ist *T. rubrum,* gefolgt von *T. mentagrophytes (var. interdigitale),* vereinzelt auch *E. floccosum* und *M. canis* (1). Verschiedene Typen von Nagelmykosen werden nicht zuletzt unter therapeutischen Aspekten unterschieden:

- Distolaterale subunguale Form
- Leukonychia trichophytica
- Proximale subunguale Form
- Dystrophische Form.

Mit Heilungsraten von nur 25-50 % nach systemischer Behandlung zeigen sich die Schwierigkeiten einer Onychomykosebehandlung (31). Bereits einige wenige Pilzelemente in den Hohlräumen des subungualen Gewebes unter der Nagelplatte können Ausgangspunkt für Rezidive sein und eine erneute Behandlung erforderlich machen.

Virulenzfaktoren

Virulenzfaktoren dienen dem Erreger zum Überleben auf dem jeweiligen Wirtsorganismus. Detailliertes Wissen darüber ist bei Dermatophyten bislang allerdings nur in geringem Umfang vorhanden, verschiedene Mechanismen werden diskutiert:

1. Ein Charakteristikum ist die Fähigkeit, in keratinisiertes Gewebe einzudringen und Infektionen hervorzurufen. Entsprechende proteolytische Serin-Proteasen aus der Subtilisin-Familie wurden aus *T. rubrum* isoliert (63). Ferner spielen Aspartat-Proteasen aus der Pepsin-Familie, Metalloproteasen sowie Hämolysine eine Rolle als Virulenzfaktoren (95, 117).
2. Einige Dermatophyten sind in der Lage, antibiotisch wirksame Substanzen zu sezernieren, was ihnen einen Standortvorteil gegenüber Mikroorganismen der Hautflora verschafft (135). Neben sonstigen ß-Lactam-Antibiotika konnte auch die Produktion von Penicillin G und Penicillin X bei *T. mentagrophytes*- und *M. canis*-Stämmen nachgewiesen werden (15, 77, 143, 144).
3. Mit Hilfe von Arthrosporen können Dermatophyten lange Zeiträume überdauern und über Jahre hinweg infektiös bleiben (114).
4. Untersuchungen der chronischen Dermatophytose mit *T. rubrum* konnten eine immunsuppressive Wirkung der Mannan-Strukturen speziell bei *T. rubrum* aufzeigen, die mit einer Lymphozytentransformation und einer Keratinozytenproliferation einhergeht (24).

Diagnostik

Das klinische Bild von Dermatophytosen der Haut, Haare oder Nägel kann sehr unterschiedlich und untypisch sein. Der mykologischen Labordiagnostik kommt daher größte Bedeutung im Rahmen einer dermatologischen Untersuchung zu. Ziel einer möglichst frühzeitigen Differenzierung einschließlich der Identifizierung auf Gattungs- wie Artebene ist ein Aufdecken der Infektionsquelle und darauf aufbauend die Vermeidung einer möglichen Reinfektion sowie eine gezieltere Therapie mit Antimykotika. Angesichts der beständigen Pathomorphose und des Erregerwandels ist eine kontinuierliche Optimierung der mykologischen Labordiagnostik unumgänglich. Die Indikation eines Erregernachweises ist auch in Zeiten wirtschaftlicher Sparmaßnahmen eher weiter denn enger zu stellen, um schwerwiegende und teure Fehldiagnosen zu vermeiden.

Konventionelle Diagnostik

Bei klinischem Verdacht auf eine Dermatophyten-Infektion stützt sich die konventionelle Labordiagnostik auf eine Kombination aus mikroskopischem Nativpräparat und kultureller Identifizierung.

Nach eingehender klinischer Inspektion erfolgt zunächst die Entnahme des Untersuchungsmaterials, dessen Art, Menge und Qualität ausschlaggebend für die erfolgreiche Isolierung und Differenzierung der Erreger ist. In den Grenzbereichen zwischen gesunden und befallenen Haut-, Haar- und Nagelbereichen befindet sich in der Regel die höchste Dichte an Dermatophyten, wovon reichlich Material mittels Schere, Skalpell, scharfem Löffel oder Fräse gewonnen wird. Eine Desinfektion mit 70 %igem Ethanol empfiehlt sich, um eine mögliche Begleitflora zu minimieren (49).

Durch das mikroskopische Nativpräparat wird der Direktnachweis von Pilzelementen in Hautschuppen oder vergleichbarem Untersuchungsmaterial geführt, eine Differenzierung auf Speziesebene ist dadurch allerdings nicht möglich (7). Nach Behandlung des Präparats mit 10-15 %iger Kaliumhydroxid- (KOH) oder 20 %iger Tetraethylammoniumhydroxid-Lösung (TEAH) und anschließender Inkubation in der feuchten Kammer lässt sich die Sensitivität und ggf. auch die Spezifität dieser Untersuchung zusätzlich durch Zugabe kontrasterhöhender Farbstoffe oder fluoreszierender Aufheller steigern (49). Eine klinische Hilfe bei der Diagnostik einer Tinea capitis stellt der Einsatz des Wood-Lichts dar: eine gelblich-grüne Fluoreszenz deutet auf eine *Microsporum*-Erkrankung hin (138).

Das Erregermaterial wird parallel zum Nativpräparat auf geeignete Kulturmedien aufgebracht und inkubiert. Als Nährmedien eignen sich Kimmig-Agar, Sabouraud-2 %-Glucose-Agar oder der käuflich zu erwerbende Mykosel®-Agar (121). Da die Haut und ihre Anhangsorgane nicht selten mit natürlicher Flora besiedelt und oftmals mit unterschiedlichsten Mikroorganismen kontaminiert sind, empfiehlt sich ein antibiotischer Zusatz wie der von Chloramphenicol und/oder Gentamicin, um ein Bakterienwachstum zu unterdrücken. Zusätzlich sollte auf ein Medium mit einem antimikrobiellen Agens wie Cycloheximid abgeimpft werden, wodurch ein mögliches Schimmel- aber auch Hefenwachstum mit Ausnahme von *C. albicans* gehemmt wird. Schimmelpilze wachsen als Anflugkeime schneller als Dermatophyten und können den Nährboden überwuchern, noch bevor ein Dermatophytenwachstum sichtbar wird. Um eine Besiedlung der freien Haut und Nägel mit fakultativ pathogenen Hefen und nagelpathogenen Schimmelpilzen wie *Scopulariopsis brevicaulis* diagnostizieren zu können, werden in mykologischen Laboren Doppelkulturen - mit und ohne Cycloheximid - angelegt.

Die Inkubationszeit der Kulturen beträgt (3-)4 Wochen bei einer Temperatur von 25 °C. Bei klinischem Verdacht auf Tinea barbae sollte zusätzliche ein Medium bei 37 °C bebrütet werden, da *T. verrucosum* als häufigster Erreger der Tinea barbae ein deutlich schnelleres Wachstum bei dieser Inkubationstemperatur aufweist (49). Um ein Austrocknen der Platten zu vermeiden, werden die Kulturen entweder in einer feuchten Kammer inkubiert oder mit einem Klebeband am Rand abgedichtet. Letzteres verhindert zudem ein Eindringen von Milben der Familie *Tyrophagus*, die sich von Sporen und Hyphen aller Dermatophyten, aber auch von Schimmelpilzen und Hefen ernähren (26).

Im Falle eines Wachstums schließt sich die makroskopische und mikroskopische Beurteilung auf morphologischer Basis an. Differenzierungskriterien sind hierbei Beschaffenheit und Größe der Kultur, Koloniefarbe, Vorhandensein von Makro- und Mikrokonidien sowie Hyphen- und Sporenformen (Tabelle 3) (51). Eine ausführliche Beschreibung der wichtigsten Artmerkmale der Dermatophyten enthalten die Verfahrensrichtlinien über die „Isolierung und Identifizierung von Dermatophyten“ (90).

	T. rubrum	**T. mentagrophytes**
Makromorphologie der Kultur		
Wachstumsgeschwindigkeit	Mittel	Schnell
Oberfläche	Weiß bis gelblich	Weiß, cremefarben bis intensiv gelb
Myzel	Flaumig, watteartig	Flaumig, samtig (anthropophil) Pudrig bis grob-granulär (zoophil)
Mikromorphologie der Kultur		
Hyphen	Septiert, wenig verzweigt	Septiert, verzweigt
Makrokonidien	Selten	Glattwandig, zylindrisch, 4-5 Kammern
Mikrokonidien	Keulenförmig	Zahlreich, kugelig
Spezielle Untersuchungen		
Kartoffel-Glucose-Agar	Bildung eines roten Pigments	Negativ
Maismehl-Glucose-Agar	Bildung eines roten Pigments	Negativ
Ureasetest	Negativ	Positiv
Haarperforationstest	Negativ	Positiv

Tabelle 3: Unterscheidungsmerkmale *T. rubrum* - *T. mentagrophytes* (nach (90))

Sofern die Resultate der Primärkultur nicht eindeutig sind, kommt eine weitergehende Testung mittels Spezialnährböden und physiologischen Tests in Frage (90). Durch Subkultur auf Kartoffel-Glucose-Agar kann beispielsweise eine rote Pigmentbildung bei *T. rubrum* induziert werden, die bei *T. mentagrophytes* nicht zu beobachten ist (21). Die Fähigkeit zur Ureasebildung und die Ausbildung von Haarperforationsorganen (2) sind hingegen bei *T. mentagrophytes* zu finden und können zur Abgrenzung zu *T. rubrum* herangezogen werden. Weitere Hinweise für die Einordnung der Dermatophyten liefern die Abhängigkeit des Wachstums von Vitaminen und Aminosäuren wie Histidin, Thiamin oder Nikotinsäure, ferner die Fähigkeit zum Wachstum auf gekochten Reiskörnern. Zur orientierenden Differenzierung bei Hautmykosen steht eine Reihe zusätzlich geeigneter Nährmedien zur Verfügung (50).

Spezielle Diagnostik

Die konventionelle Dermatophyten-Diagnostik lässt gelegentlich keine eindeutige Identifizierung bzw. Charakterisierung der Erreger zu, weshalb in Einzelfällen auf spezielle Untersuchungsmethoden zurückgegriffen werden kann:

Die Leitlinie „Tinea der freien Haut“ der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft nennt hierzu die Charakterisierung der Antimykotika-Empfindlichkeit im Makro- und Mikrodilutionstest (121). Allerdings sind Unterschiede auf Artebene bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber relevanten Antimykotika bisher nur zwischen *T. rubrum* und *T. mentagrophytes* im Mikrodilutionstest mit Griseofulvin beschrieben worden (75).

Histologische Untersuchungen spielen eine eher untergeordnete Rolle im mykologischen Routinelabor, stellen jedoch eine mögliche Option in der Diagnostik von Nagelpilzerkrankungen dar (54). Weitere Techniken umfassen die Identifizierung mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) (5) oder den Einsatz eines konfokalen Lasermikroskops (101).

Molekulargenetische Diagnostik

Molekulargenetische Methoden haben derzeit noch nicht oder kaum Eingang in die Routinediagnostik von Dermatophyten gefunden. Deutliche Vorteile gegenüber konventionellen Techniken, wie die Unabhängigkeit von distinkten morphologischen Veränderungen und Entwicklungsstadien der Erreger, die Sensitivität, Spezifität sowie die

Schnelligkeit, mit der eine Differenzierung auf Speziesebene unter Umständen möglich ist, sollten PCR-Assays attraktiv für eine neue Ära der Dermatophytendiagnostik machen.
Neben der Restriktionsfragmentanalyse (RFLP) (94), der sogenannte „Arbitrarily Primed PCR" (AP-PCR) (82), der "Randomly Amplified Polymorphic DNA" (RAPD) (73) und dem PCR-Fingerprinting (33) wurden Southern-Blotting- (93) und Sequenzierungs-Assays (43) für die Pilzdetektion und Identifizierung entwickelt, allerdings sind diese für eine Routineanwendung im mykologischen Labor aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit und Anwendbarkeit für große Probenzahlen wenig geeignet. AP-PCR und RAPD-Techniken gelten als sehr anfällig für geringe Änderungen in den PCR-Bedingungen, was unterschiedliche Bandenmuster bei gleichen Proben zur Folge haben kann (64). Restriktionsfragmentanalysen wiederum benötigen je PCR-Lauf eine umfangreiche Anzahl an Referenz-Stämmen, ferner ist die Auswertung relativ komplex und aufwändig. Die Sequenzierung bietet sicherlich eine sehr genaue Differenzierungsmöglichkeit, ist für große Probenmengen in der Routine allerdings ebenfalls kaum durchführbar (103).
Nicht jeder genetische Unterschied steht in Übereinstimmung mit der klassischen taxonomischen Gattungs- oder Arteinteilung, weshalb die stete Weiterentwicklung anwendungsorientierter, PCR-gestützter Diagnoseverfahren im Sinne eines Fortschritts der Mykologie angestrebt werden muss.

Therapeutische Optionen

Zur Behandlung von Dermatophytosen steht eine Reihe topisch und/oder systemisch einsetzbarer Antimykotika zur Verfügung. Die Art der Therapie wie auch die für den Einzelfall geeignete Applikationsform richtet sich nach Lokalisation, Ausprägung, Kontagiosität, Ausdehnung und Tiefe der Infektion sowie nach Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil, Kontraindikationen und Wechselwirkungen des Antimykotikums mit anderen Medikamenten.
Die chemische Einteilung der in der Humanmedizin angewandten Antimykotika erfolgt in zehn verschiedene Substanzklassen:

- Allylamine
- Benzofurane
- Echinocandine
- Hydroxypyridone
- Imidazole
- Morpholine
- Polyene
- Pyrimidine
- Thiocarmbamate
- Triazole

Hauptangriffspunkte der Antimykotika stellen die zytoplasmatische Membran sowie Eingriffe in den Chitinaufbau, die Kernteilung, Nukleinsäuresynthese, Enzymregulation und die Atmungskette dar. Darüber hinaus ist zwischen fungistatischen und fungiziden Präparaten zu unterscheiden, wobei nur Amphotericin B, Ciclopiroxolamin und Terbinafin über eine ausgesprochene Fungizidie verfügen (128). Für die Therapie von Dermatophytosen sind neben der Kenntnis des Erregers und des Übertragungsweges auch der Wirkmechanismus und -modus des eingesetzten Antimykotikums von großer Wichtigkeit, um eine rasche und dauerhafte Heilung zu erzielen.

Eine Tinea der freien Haut wird im Regelfall lokal mit Vertretern der Azole (Clotrimazol, Miconazol, Econazol, Bifonazol, Sertaconazol, Tioconazol), Hydroxypyridone (Ciclopiroxolamin), Allylamine (Naftifin, Terbinafin) oder der Morpholine (Amorolfin) über 3-4 Wochen, bei Terbinafin im Falle der häufigen Tinea pedis vom interdigitalen Typ über eine Woche hinweg behandelt. Eine systemische Behandlung mit Griseofulvin, Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol oder Terbinafin kann erforderlich werden, wenn die topische Therapie versagt oder ein begründeter Verdacht auf mangelnde Wirksamkeit, z. B. bei ausgesprochen großer Ausdehnung oder hyperkeratotischer Tinea pedum vorliegt.

Lange Therapiezeiten, geringe Heilungsraten zwischen 25 und 50 % (31) und beachtliche Rezidivquoten bis zu 53 % gestalten die Therapie einer Onychomykose äußerst schwierig (123). Eine Lokalbehandlung bei distaler Onychomykose kann mit Ciclopirox- oder Amorolfin-Nagellack versucht werden, die systemische Behandlung erfolgt in Mono- oder Kombinationstherapie zusätzlich zu einer Lokalbehandlung mit Griseofulvin, Fluconazol, Itraconazol oder Terbinafin.

Eine Tinea capitis muss in jedem Fall kombiniert lokal und systemisch behandelt werden, wobei sich die orale Therapie zwischen Erwachsenen und Kindern rechtlich und pharmakokinetisch unterscheidet (121): Lediglich Griseofulvin ist derzeit bei Kindern unter einem Jahr in Deutschland zugelassen, Fluconazol für Kinder über einem Jahr nur bei Fehlen einer therapeutischen Alternative. Daneben kommen für die Behandlung Erwachsener auch die neueren Antimykotika Terbinafin und Itraconazol in Frage. Letztere beiden weisen sehr hohe Konzentrationen im Sebum auf. Da Kinder allerdings erst im Laufe der Pubertät Talgdrüsen entwickeln, ist die Möglichkeit der Wirkstoff-Diffusion vom Sebum auf bzw. ins Haar nicht gegeben und sporozide Wirkstoffkonzentrationen, die für eine Abtötung von Pilzsporen benötigt werden, können unter Umständen nicht erreicht werden. Unterstützende topische Antimykotika, wie Ciclopiroxolamin, Terbinafin oder auch Tolnaftat und Tolciclat verkürzen die systemische Behandlung und verringern die Infektionsgefahr für andere Personen.

Der Erfolg jeder Behandlung muss ausreichend kontrolliert werden und eine Therapie sollte erst nach negativer Pilzdiagnostik beendet werden.

Entwicklung molekularer DNA-Analytik

Polymerase-Kettenreaktion

Ein Meilenstein in der Entwicklung der Molekulardiagnostik war 1983 die Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion durch Kary Mullis. Während einer nächtlichen Autofahrt in den kalifornischen Bergen kam Mullis die grundlegende Idee für die Vervielfältigung der DNA mittels zweier flankierender Primer, die er im Jahre 1985 veröffentlichte (116) und wofür er bereits sieben Jahre später den Nobelpreis für Chemie verliehen bekam.

Insbesondere die Einführung einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) (115) hat den PCR-Prozess wesentlich vereinfacht und die Automatisierung erst ermöglicht.

Die PCR ist inzwischen nicht mehr aus der Molekularbiologie wegzudenken und bietet schier unerschöpfliche Anwendungsgebiete: Neben der Detektion von Mikroorganismen sind Gentests, Resistenztestungen, Mutationsanalysen, genetische Fingerabdrücke bis hin zur Entschlüsselung des menschlichen Genoms ohne PCR nicht mehr vorstellbar. Proteinexpressionsmuster können nach reverser Transkription und folgender PCR (RT-PCR) geringer Mengen spezifischer messenger-RNA (mRNA) verfolgt und detektiert werden.

Quantitative Bestimmungen erlauben Rückschlüsse auf die ursprüngliche Template-Menge und ermöglichen verschiedenste Anwendungen, von der medizinischen Diagnostik über die Targetsuche bis hin zur Grundlagenforschung. Letztlich eröffnet die PCR auch den Weg zur Klonierung und Gentherapie.

Seit wenigen Jahren bekommt die PCR in einigen Einsatzbereichen Konkurrenz durch die Verwendung empfindlicher DNA-Microarrays, allerdings ist dabei oft eine Vervielfältigung der gesuchten DNA im Voraus nötig, weshalb PCR und DNA-Microarrays häufig ineinander greifen.

Das Grundprinzip der PCR beruht auf einem wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten zur enzymatischen in-vitro-Amplifikation von DNA-Molekülen:

Ein doppelsträngiges DNA-Fragment wird zunächst unter Hitzeeinwirkung bei etwa 95 °C aufgeschmolzen („Denaturierung“). Die nun vorliegenden Einzelstränge dienen als Matrize für die enzymatisch katalysierte Polymerisation von zugegebenen Desoxyribonukleotiden, so dass in Folge wieder doppelsträngige DNA-Amplifikate gebildet werden. Bei etwa 55-60 °C lagern sich die Primer an die komplementären Sequenzen der Einzelstränge an („Annealing“) und markieren die Startpunkte für die Tätigkeit der Polymerase. Nach Temperaturerhöhung auf 72 °C findet die Verlängerung des Komplementärstranges statt („Elongation“), wodurch sich pro PCR-Zyklus die Anzahl der ursprünglichen DNA-Moleküle theoretisch verdoppelt.

Allerdings wird die exponentielle Produktneubildung in vitro durch verschiedene Faktoren begrenzt. In späteren Zyklen lässt die Aktivität der Enzyme aufgrund des ständigen Temperaturwechsels wie auch die Menge an verfügbaren Nukleotiden nach, außerdem verbinden sich neu gebildete Templates vermehrt nicht mehr mit Primern, sondern untereinander. In der Praxis nimmt die Amplifikationsrate dementsprechend mit steigender Zykluszahl ab, die Nettoproduktbildung geht schließlich auf Null zurück und die Gesamtmenge an PCR-Produkt erreicht einen Plateauwert.

Als Schlüsselenzym der PCR dient eine 5'-3'-DNA-abhängige Polymerase, die bei einem Temperaturoptimum von 75 °C die DNA-Sequenz des Einzelstranges abliest und den komplementären Doppelstrang in 5'-3'-Richtung synthetisiert. Eine Polymerisation in umgekehrter Richtung ist nicht möglich. Daneben werden Primer - einzelsträngige Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 20-25 bp - benötigt, die das zu amplifizierende DNA-Fragment bestimmen, weiters geeignete Reaktionspuffer, Mg^{2+} als Kofaktor für die *Taq*-Polymerase sowie die vier Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) als Desoxyribonukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

Zum Nachweis der generierten PCR-Produkte kommen verschiedene Systeme zum Einsatz:

- Gelelektrophorese

  Die Gelelektrophorese bietet ein einfaches Verfahren zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Dabei wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld in Richtung Anode, kurze Fragmente schneller als lange. Die zurückgelegte Laufstrecke ist umgekehrt proportional zur Fragmentgröße. Als Gelmatrix wird Agarose oder Polyacrylamid verwendet. Die Amplikongröße wird mit Hilfe von Molekulargewichtsmarkern, die parallel auf das Gel aufgetragen werden, vergleichend bestimmt.

- Southern Blot

  Eine höhere Sensitivität kann durch Southern Blots erzielt werden: Hierbei werden die Fragmente nach der Gelelektrophorese auf eine Membran übertragen und mit spezifischen Sonden hybridisiert. Bei den Sonden handelt es sich um einsträngige Oligonukleotide, die in der Regel radioaktiv markiert sind. Erfolgte Hybridisierungen können anschließend durch Filmschwärzung sichtbar gemacht werden.

- PCR-ELISA

  Voraussetzung für ELISA-Techniken ist die Markierung der DNA bereits während der PCR. Eine häufig verwendete Markierung ist hierbei Digoxigenin. Nach Denaturierung des Amplikons, Hybridisierung mit biotinylierten DNA-Sonden, Hybridisierung der Sonden an der mit Streptavidin beschichteten Oberfläche einer Mikrotiterplatte und Zugabe von Anti-Digoxigenin-Antikörpern kann über einen Enzymindikator am Antikörper ein chromogenes Substrat umgesetzt und ein Farbumschlag gemessen werden (siehe 0).

Real-time PCR

Die sogenannte Echtzeit-PCR (Real-time PCR) erlaubt eine Beobachtung des PCR-Reaktionsverlaufs durch die Messung der Produktakkumulation anhand von Fluoreszenzlicht. Über die Größe des Fluoreszenzsignals kann die exponentielle Phase der PCR-Reaktion identifiziert und in Folge für eine Quantifizierung der Templatemenge sowie weitergehender Anwendungsmöglichkeiten nutzbar gemacht werden.

Die produktabhängige Fluoreszenz wird durch dsDNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe, wie dem derzeit gebräuchlichsten Farbstoff SYBR-Green, oder aber durch fluorophormarkierte Oligonukleotidsonden gemessen (siehe 0).

Der Farbstoff SYBR-Green bindet weitgehend sequenzunspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA und fluoresziert nach Anregung etwa 1000mal stärker als der freie Farbstoff (96, 141), was ihn für eine Echtzeit-Messung des Anstiegs der gebildeten Templatemenge so geeignet macht. Neben verschiedensten quantitativen Anwendungsmöglichkeiten, von der medizinischen Diagnostik über die Targetsuche bis hin zur Grundlagenforschung werden in geringerem Umfang auch die qualitativen Aspekte z. B. der Schmelzkurvenanalyse genutzt.

Die sequenzspezifische Detektion durch Sonden bietet ein größeres Spektrum an qualitativen Genanalyse-Assays: Hierbei wird entweder die Zunahme des Resonanzenergietransfers oder aber die produktabhängige Abnahme der Löschung einer Reporter-Fluoreszenz von einem Donor- auf ein Akzeptorfluorophor gemessen. Genotypisierungen mit Hilfe der Real-time PCR erlauben bei der Untersuchung von Polymorphismen, wie sie bei Spezies-Bestimmungen, Bestimmungen von genetischen Risikofaktoren und Erkrankungen wie auch bei Vaterschaftstests zur Anwendung kommen, eine rasche und kostengünstige Analyse, was die Entwicklung weiterer Assays vorantreiben wird.

Zielsetzung der Arbeit

Zu den Grundlagen einer optimalen mykologischen Diagnostik von Dermatophyten gehören neben dem klinisch geschulten Blick die korrekte Materialentnahme sowie die Identifikation des Krankheitserregers. Das verfügbare Methodenspektrum reicht hierbei vom Nativpräparat über die Pilzkultur und spezielle Diagnostik-Techniken hin zu molekulargenetischen PCR-Methoden. Letztere fanden jedoch aufgrund mangelnder Anwendbarkeit, Sensitivität und Spezifität bislang keinen nennenswerten Eingang ins Routinelabor (4).

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Entwicklung und Etablierung einer molekularen Spezies-spezifischen Sofortdiagnostik von Dermatophyten, die sowohl im klinischen Mykologie-Labor als auch im Praxislabor mit einfachem personellem und apparativem Aufwand durchführbar ist und zudem die Vorteile einer genanalytischen Methode, wie die Unabhängigkeit von morphologischen Merkmalen, physiologischen Kriterien sowie der Vitalität der Erreger, vereint. Zunächst sollte die Isolierung von Dermatophyten-DNA direkt aus nativem Patientenmaterial (Hautschuppen, Nagelmaterial) optimiert werden, da bislang mit wenigen Ausnahmen Techniken beschrieben wurden, die Material aus gewachsenen Pilzkulturen zur Grundlage hatten (3, 18, 28, 69, 71, 87, 132).

Neben einer „klassischen“ PCR-gestützten Technik sollte ferner eine Real-time-PCR-basierte Methode entwickelt werden, die eine einfache 24-Stunden-Identifizierung der häufigsten Dermatophyten-Spezies ermöglicht und im Hinblick auf Schnelligkeit, Sensitivität und Spezifität deutliche Vorteile gegenüber den konventionellen Diagnose-Techniken Nativpräparat und Pilzkultur bietet.

Ein weiterer Schwerpunkt befasst sich im Rahmen einer oligozentrischen Studie mit der Frage der Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit der etablierten molekularbiologischen PCR-ELISA-Methode in verschiedenen mykologischen Laboren. Neben den Ergebnissen aus einem Praxislabor in einer Gemeinschafts-Hautarztpraxis wurden die Ergebnisse aus zwei klinischen Mykologie-Laboren einbezogen und mit den Resultaten aus der parallel durchgeführten konventionellen Diagnostik mittels Nativ- und Kulturpräparat verglichen.

2. MATERIAL UND METHODEN

Material

Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage LP 1200S	Sartorius, Göttingen
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Blockthermostat BT 1301, HLC	MS Laborgeräte Schröder, Wiesloch
Digitalkamera SP-500 UZ	Olympus, Hamburg
Elektrophoresegerät E734	Consort, Turnhout, B
ELISA-Reader	Mikrotek Laborsysteme, Overath
LightCycler 1.0	Roche Diagnostics, Mannheim
Mehrkanalpipetten	Rainin, Woburn, USA
Mikrowelle HMG 3103	Bosch Hausgeräte, Stuttgart
Multipette 4780	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schwarzweiß-Vergrößerer Cosmicar TV	Kaiser Fototechnik, Buchen
Thermocycler iCycler	BioRad, München
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 16/18	Neolab, Heidelberg
UV-Transilluminator TFX 20M	Biometra, Göttingen
Video Copy Processor P68E	Mitsubishi Electric, Hong Kong

Tabelle 4: Geräte

Datenbanken

Die Internet-Seiten sind über das Hypertext transfer Protocol (http://) aufzurufen.

Datenbank	Internet-Adresse
PubMed Medline	www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/
European Bioinformatics Institute	www.srs.ebi.ac.uk/

Tabelle 5: Datenbanken

Software

Programm	Hersteller
Adobe Illustrator 9.0.2	Adobe Systems, San Jose, USA
Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems, San Jose, USA
GeneDoc 2.6.002	Karl Nicholas, Pittsburgh, USA
LightCycler Software Version 3	Roche Diagnostics, Mannheim
- Data Analysis 3.5.28	
- Run 5.32	
MikroWin 3.0	Mikrotek Laborsysteme, Overath
Primer3	Rozen et al. (113)
Reference Manager 10	Adept Scientific, Frankfurt
SPSS 14.0	SPSS, Chicago, USA
Windows XP (Excel, Power Point, Word)	Microsoft Corp., Redmond, USA

Tabelle 6: Software

Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
ELISA-Platten	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler Capillaries	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR-Micro Tubes:	Sarstedt, Nümbrecht
- Multiply-Strip 0,2 ml Kette	
- Deckelkette 0,2 ml Biosphere	
Mikroschraubröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Quick Sephadex G-50-Säulen	Roche Diagnostics, Mannheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Pellet Pestle	Kontes, Vineland, USA
Quick Sephadex G-50-Säulen	Roche Diagnostics, Mannheim

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Reagenzien

Reagenzien	**Hersteller**
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Blue Juice Gel Loading Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
BM Blue POD Substrate, soluble	Roche Diagnostics, Mannheim
Chemagic DNA Tissue Kit	Chemagen, Baesweiler
Chlorazol Black E	Sigma, Taufkirchen
Cycloheximid	Roth, Karlsruhe
DMSO	Fluka, Buchs, CH
DNA-Standard (ΦX174, *Hae*III Digest)	Peqlab, Erlangen
dNTP-Mix	Peqlab, Erlangen
Easy Pure DNA Purification-Kit	Biozym, Oldendorf
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Genomische Human-DNA	Roche Diagnostics, Mannheim
Gentamicinsulfat	Roth, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
*Hae*III, 5x Reaktionspuffer	Biozym, Oldendorf
Invisorb Fungi Kit	Invitek, Berlin
KOH	Merck, Darmstadt
LightCycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler Fast Start DNA Master^{PLUS} Hybridization Probes	Roche Diagnostics, Mannheim
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Nucleo Spin Tissue Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Oligonukleotide	Tib Molbiol, Berlin
PCR ELISA, DIG-Detection	Roche Diagnostics, Mannheim
Pepton	Merck, Darmstadt

Phenolrot (=Phenolsulfonphthalein)	Merck, Darmstadt
Puregene DNA Isolierungskit	Biozym, Oldendorf
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Standard II Nährbouillon	Merck, Darmstadt
TAE-Puffer	Biozym, Oldendorf
Taq DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen

Tabelle 8: Reagenzien

Pilzstämme

Folgende Dermatophytenspezies wurden als Referenzstämme sowie als Positivkontrollen verwendet:

Spezies	**Labor-/Referenznummer**
Dermatophyten	
E. floccosum	847.05
M. audouinii	4247.04
M. canis	330.05
M. canis	589.05
M. gypseum	2501.05
M. gypseum	2356.05
T. mentagrophytes var. *mentagrophytes*	2040.05
T. interdigitale	ATCC 28939
T. interdigitale	CBS 558.66
T. interdigitale	724.04
T. interdigitale	973.04
T. interdigitale	4927.04
T. interdigitale	2023.05
T. interdigitale	5588.05
T. rubrum	ATCC 10218
T. rubrum	580.04
T. rubrum	1049.04

T. rubrum	2173.05
T. rubrum	4264.05
T. rubrum	5297.05
T. rubrum	5584.06
T. rubrum	5738.06
T. rubrum	5894.06
T. rubrum var. *nigricans*	1926.04
T. schoenleinii	1130.05
T. tonsurans	2317/01
T. tonsurans	1845/01
T. tonsurans	2301/02
T. tonsurans	82/01
T. verrucosum	3085.04
T. violaceum	903.05
Hefen	
C. albicans	268.06
C. parapsilosis	2793.04
Schimmel	
Scop. brevicaulis	2943.05

Tabelle 9: Referenzstämme

Patientenkollektiv

Unbehandelte Patientenproben wurden im Rahmen der oligozentrischen Studie im Zeitraum vom 12.2.-14.6.2006 konsekutiv in den drei Testzentren

- Mykologisches Labor der Dermatologischen Klinik der LMU München
- Mykologisches Labor der Hautklinik der EKU Tübingen
- Praxislabor der Gemeinschaftspraxis Bezold/Gottlöber, Neu-Ulm

gesammelt und mittels konventioneller Diagnosemethoden, PCR-ELISA sowie für die Münchner Proben auch mit Real-time PCR auf Dermatophyten hin untersucht. Die Proben wurden dabei im jeweiligen Labor vor Ort verarbeitet, die Übereinstimmung des Materials und der angewandten Techniken war durch das Vorgehen nach einer Standardarbeitsanleitung gewährleistet.
Weitere native Patientenproben für die Entwicklung der PCR-Methoden stammten ausschließlich aus dem Mykologischen Labor der Dermatologischen Klinik der LMU München.

Methoden

Konventionelle Diagnostik der Pilzkulturen

Probenentnahme

Die Entnahmestelle wurde vor der Probengewinnung mit 70 %igem Ethanol desinfiziert, um die kontaminierende Begleitflora zu reduzieren. Im Grenzbereich zwischen gesunder und befallener Haut-, Haar-, und Nagelbereiche befindet sich in der Regel die höchste Dichte an Dermatophyten, wovon reichlich Material mittels steriler Schere, Skalpell, scharfem Löffel oder Fräse gewonnen wurde. Abstriche sind ungeeignet zum Nachweis von Dermatophyten. Nagelstücke wurden mit einem Skalpell zerkleinert, um die Oberfläche zu vergrößern. Für den internen Transport von dermatologischen Proben wurden mit Deckel dicht verschließbare Kunststofftöpfchen verwendet.

Nativpräparat

Das Untersuchungsmaterial wurde auf einem Objektträger nach Behandlung mit 7,5 %iger KOH-Lösung unter Zusatz von 10 % DMSO und 0,12 % des Farbstoffs Chlorazol Black E in der feuchten Kammer inkubiert und anschließend lichtmikroskopisch untersucht.

Pilzkultur

Referenzstämme und klinische Pilzisolate wurden auf einer Kombination zweier Kimmig-Agar-Nährböden bei 25 °C angezüchtet. Zur Unterdrückung des Schimmelpilzwachstums wurde eine Kultur mit 0,4 % Cycloheximid versetzt, eine zweite Kultur enthielt 0,08 % Gentamicinsulfat zur Verhinderung des Bakterienwachstums. Die Kultur wurde drei bis vier Wochen aufbewahrt und wöchentlich makroskopisch auf Pilzwachstum hin kontrolliert. Im Falle eines Wachstums erfolgte die makroskopische Beurteilung des Wachstumsbildes, der Farbstoffbildung und mikroskopisch der Ausbildung von Makro- und Mikrokonidien.

Spezielle Untersuchungsverfahren

In Einzelfällen wurde die Abgrenzung zwischen *T. rubrum* und *T. mentagrophytes* durch Subkulturen auf Urease- oder Kartoffel-Glucose-Agar oder durch einen Haarperforationstest ergänzt.

Urease-Test:

T. mentagrophytes-Isolate besitzen Urease-Aktivität und induzieren einen Farbumschlag des Indikators Phenolrot im Urease-Agar von gelb nach rot. Für eine korrekte Beurteilung des Tests ist der genaue Ablesetermin nach einer Woche wichtig, da auch sog. Urease-negative Dermatophyten bei längerer Beobachtung eine gewisse Ureaseaktivität zeigen.

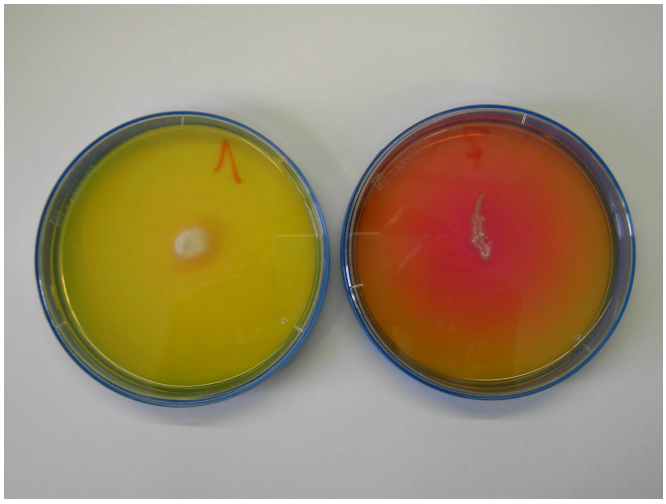

Abbildung 1: Urease-Test: Fehlende Urease-Bildung von *T. rubrum* (links) im Vergleich zu *T. mentagrophytes* (rechts)

Kartoffel-Glucose-Agar:

Die Bildung eines roten Pigments an der Rückseite einer Kulturplatte mit Kartoffel-Glucose-Agar wird hingegen durch *T. rubrum* stimuliert, was zur Unterscheidung zu *T. mentagrophytes* dient.

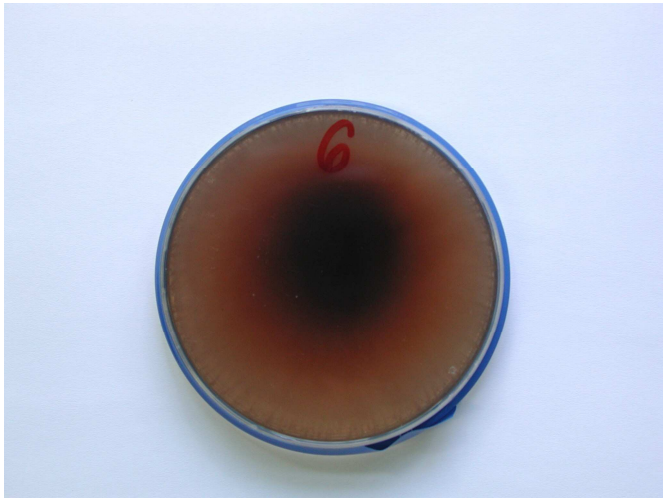

Abbildung 2: Kartoffel-Glucose-Agar: Rote Pigmentbildung durch *T. rubrum*

Haarperforationstest:

T. mentagrophytes besitzen die Fähigkeit, unter bestimmten Bedingungen perforierende Organe an Haaren auszubilden (Abbildung 3). Hierzu wurden blonde, feine menschliche Haare in ca. 3 cm lange Stücke geschnitten, autoklaviert und in Petrischalen in steriles Wasser gegeben. Nach Zugabe einiger Tropfen einer wässrigen Hefeextrakt-Lösung wurde Myzel aus einer Reinkultur des zu untersuchenden Dermatophyten zugesetzt. Im Verlauf von 2 - 4 Wochen bildeten sich bei positivem Nachweis Haarperforationsorgane aus, die zapfen- oder keilförmigen Hohlräumen ähneln (90).

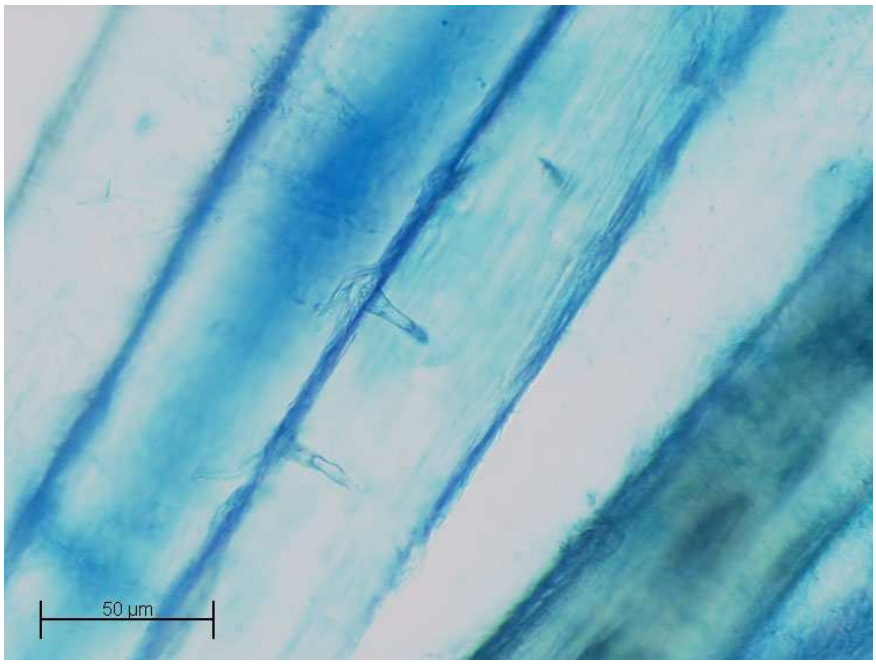

Abbildung 3: Ausbildung von Haarperforationsorganen durch *T. mentagrophytes* mit zapfenförmiger Lyse, Färbung mit Chlorazol Black E

DNA-Isolierung

DNA-Präparation aus Patientenproben

Zur Isolierung von Dermatophyten-DNA aus 3-25 mg infiziertem Haut-, Haar- und Nagelmaterial wurden verschiedene kommerziell erhältliche Kits entsprechend den Angaben der Hersteller getestet:

Chemagic® DNA Tissue Kit (Chemagen, Baesweiler)
Dynabeads® DNA Direct Universal (Dynal Biotech, Hamburg)
Easy Pure® DNA Purification Kit (Biozym Scientific, Oldendorf)
Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Invitek, Berlin)
Nucleo® Spin Tissue Kit (BD Biosciences, Heidelberg)
Puregene® DNA Purification Kit (Biozym, Oldendorf)
QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)
S&S Elu-Quick® (Schleicher & Schuell, Basel)

Im Rahmen der Etablierung der PCR-ELISA-Methode sowie der Dermatophyten-Diagnostik am LightCycler wurde schließlich das QIAamp DNA Mini Kit ausgewählt und ausschließlich verwendet.
Hierzu wurde 3-25 mg Schuppen- bzw. Nagelmaterial in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben und mit 180 µl Puffer ATL versehen. Dieser Lysepuffer enthält SDS, das die zellulären Proteine denaturiert, und NaOH, das neben der Zelllyse die chromosomale und Plasmid-DNA denaturiert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K-Lösung und kurzem Vortexen wurden die Proben bei 56 °C im Thermomixer unter ständigem Schütteln bei 500 rpm für 16 h inkubiert. Anschließend wurde die lysierte Probe mit 200 µl Puffer AL gemischt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurden 200 µl Ethanol absolut (≥99,8 %) zugegeben und die Mischung durch eine QIAamp-Säule mit einer DNA bindenden Silikat-Matrix 1 min bei 16.000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, die Säule einmal mit 500 µl Puffer AW1 und ein zweites Mal mit 500 µl Puffer AW2 gewaschen und jeweils 1 min bei 16.000 g zentrifugiert. Um restliche Ethanol-Spuren vollständig zu eliminieren, wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 20.000 g 3 min lang angefügt. Die DNA wurde danach mit 50 µl Puffer AE eluiert.
Die genauen Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen von QIAGEN wurden vom Hersteller nicht angegeben.

DNA-Präparation aus Pilzkulturen

Die DNA-Isolierung aus gewachsenen Pilzkulturen erfolgte wie unter 2.2.2.1 beschrieben, mit einer zusätzlichen Modifikation zu Beginn der Präparation:
Nach Zugabe des Lysepuffers ATL wurde das Luftmycel mit einem Plastikpistill durch etwa 10maliges Mörsern zerkleinert und im Puffer homogen suspendiert. Anschließend wurde nach Protokoll weiterverfahren.

Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde in einem iCycler™ durchgeführt. Das Reaktionsgemisch enthielt Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, Tween 0,01 %, die Desoxytriphophatnukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils 250 mM, Upstream- und Downstream-Primer jeweils 0,5 µM (siehe Tabelle 17 und Tabelle 18) und *Taq*-Polymerase 1 U.

Reagenz	Volumen [µl]	Endkonzentration
PCR-Puffer (10x)	4	1x
$MgCl_2$ (25 mM)	1,6	2,5 µM
dNTP (10 mM)	1	250 µM
Upstream-Primer (20 µM)	1	0,5 µM
Downstream-Primer (20 µM)	1	0,5 µM
Taq-Polymerase (5 U/l)	0,2	1 U
ddH_2O	27,2	
DNA	4	
Gesamtvolumen	40	

Tabelle 10: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Reagenz	Konzentration
Tris-HCl (pH 8,8)	100 mM
KCl	500 mM
Tween 20	0,1 %
$MgCl_2$	15 mM

Tabelle 11: Zusammensetzung des PCR-Puffers (10-fache Endkonzentration)

Jede Probe wurde im PCR-Gefäß mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um eine Kondensation am Deckel während der Amplifikation auszuschließen.

Folgende Amplifikations-Protokolle kamen im Rahmen der PCR am Thermocycler zum Einsatz:

Reaktionsschritt		**Temperatur [°C]**	**Dauer [s]**
Initiale Denaturierung		95	180
Amplifikation	Denaturierung	95	60
	Annealing	55	60
	Elongation	72	60
Terminale Extension		72	600
Zyklenanzahl: 40			
Gesamtdauer: 2,5 h			

Tabelle 12: PCR-Amplifikations-Protokoll für das Primerpaar TR1/TR2

Reaktionsschritt		**Temperatur [°C]**	**Dauer [s]**
Initiale Denaturierung		95	300
Amplifikation	Denaturierung	95	60
	Annealing	36	45
	Elongation	72	90
Terminale Extension		72	600
Zyklenanzahl: 35			
Gesamtdauer: 2 h			

Tabelle 13: PCR-Amplifikations-Protokoll der AP-PCR (Primer OPAA11, OPD18) und der Fingerprint-PCR (Primer AP3, M13)

Reaktionsschritt		**Temperatur [°C]**	**Dauer [s]**
Initiale Denaturierung		94	120
Amplifikation	Denaturierung	94	18
	Annealing	58	18
	Elongation	72	180
Terminale Extension		72	600
Zyklenanzahl: 30			
Gesamtdauer: 2 h			

Tabelle 14: PCR-Amplifikations-Protokoll für die Primer-Systeme TRS1 und TRS2

Reaktionsschritt		Temperatur [°C]	Dauer [s]
Initiale Denaturierung		95	300
Amplifikation	Denaturierung	95	60
	Annealing	61	60
	Elongation	72	18
Terminale Extension		72	600
Zyklenanzahl: 40			
Gesamtdauer: 2 h			

Tabelle 15: PCR-Amplifikations-Protokoll für RFLP (Primer ITS1, ITS2)

Reaktionsschritt		Temperatur [°C]	Dauer [s]
Initiale Denaturierung		95	300
Amplifikation	Denaturierung	95	15
	Annealing	60	30
	Elongation	72	30
Terminale Extension		72	450
Zyklenanzahl: 42			
Gesamtdauer: 2 h			

Tabelle 16: PCR-Amplifikations-Protokoll für PCR-ELISA

Primer	Literatur	Nukleotidsequenz (5' → 3')
TR1	Bock et al. 1994 (17)	GTT TCT AGG ACC GCC GTA
TR2	Bock et al. 1994 (17)	CTC AAA CTT CCA TCG ACT TG
OPAA11	Liu et al. 2000 (81)	ACC CGA CCT G
OPD18	Liu et al. 2000 (81)	GAG AGC CAA C
AP3	Williams et al. 1990 (140)	TCA CGA TGC A
M13	Huey et al. 1989 (59)	GAG GGT GGC GGT TCT
TrNTSF2	Jackson et al. 2000 (61)	ACC GTA TTA AGC TAG CGC TGC
TrNTSR4	Jackson et al. 2000 (61)	TGC CAC TTC GAT TAG GAG GC
TrNTSR1	Jackson et al. 2000 (61)	CTC AGT CGA ACC GTG AGG C
TrNTSC1	Jackson et al. 2000 (61)	CGA GAC CAC GTG ATA CAT GCG
ITS1	Diese Arbeit	GTC ATT TCA ACC CCT CAA GC
ITS2	Diese Arbeit	CGG GTA TCC CTA CCT GAT CC

Tabelle 17: PCR-Primer

Folgende Oligonukleotide wurden für die PCR-ELISA-Reaktion verwendet:

Spezies	**Amplifikat-Länge [bp]**	**Primer**	**Nukleotidsequenz (5' → 3')**
T. rubrum	923	U	GCC TGT TGT TCC GCT CAT TCT T
		D*	CGG CTA GGA GGG CGT GGT AGA A
T. interdigitale	390	U	GCA TGA TTT AGA AGT GTA ATG CTG
		D*	GGT GCC AGC CAT GTC GTA GAC
T. violaceum	419	U	GAT CCA CAA GGT ATG TAT TAG TTA
		D*	GGT GCC AGC CAT GTC GTA GAC
M. canis	637	U	GCT GGT AAA TAA CAC CGA TGA TGG
		D*	TGT ATC TGA TAT GCA TAC CTT CC
E. floccosum	1334	U	CCG TTT CGT CCA AAT GAT TAT CGA C
		D*	GAT TCA GTT GTG ACT AAG TGG ACA
ß-Globin	268	U	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC
		D*	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

Tabelle 18: Primer für PCR-ELISA

U: Upstream-Primer

D*: Downstream-Primer, Modifikation 5'-Digoxigenin

Spezies	**Nukleotidsequenz (5' → 3')**
T. rubrum	CAT ATG ATT ACC TTC TGA GCG TAA
T. interdigitale	ATT CTT TCA TAG AAA GAG CAA ATC T
T. violaceum	TAG TGC ATG ATT TAA AAG CGT AAT
M. canis	TAC GCT GTC CGT ATC AAG CTA T
E. floccosum	TGA CTA CCT TTT GAG TGT AAG TTC C
ß-Globin	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC
Mimic (interne Kontrolle)	CAA TCA GCT CAC GAA ACT TG

Tabelle 19: Hybridisierungssonden für PCR-ELISA: Modifikation 5'-Biotin

Intern kontrollierte PCR

Das Auftreten einer Inhibition des Reaktionsablaufes muss nach den „Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik - Nukleinsäure-Amplifikationstechniken“ (111) für jede Probe bestimmbar sein. Hierzu wurden interne Kontrollen, sogenannte Mimics, entwickelt, die aus künstlichen DNS-Fragmenten bestehen und die identische Primersequenzen wie das nachzuweisende Fragment (=Target) enthalten, sich in ihrer Intermediärsequenz allerdings vom Target unterscheiden (122). Die internen Kontrollen werden kompetitiv zum Target amplifiziert, eine Unterscheidung bei der Vervielfältigung in Target- oder Mimic-Fragment ist in der PCR also nicht möglich. Im Idealfall ist auch die Amplifikationseffizienz von Target und Mimic identisch (122).

Synthese und Stabilisierung der internen Kontrollen

Die Mimics wurden unter Verwendung einer „neutralen DNS“, einem Nukleinsäurefragment des humanen Actin-Gens, hergestellt. Die Primersequenz des Targets wurde mit dem 3’-Ende an das 5’-Ende einer Sequenz gekoppelt, die in der neutralen DNS bindet, und am 5’-Ende durch 10 Random-Nukleotide geschützt. Durch diese Composite-Primer zeigen die Mimic-Fragmente eine deutlich höhere Stabilität gegenüber langsamem Abbröckeln einzelner Nukleotide an den freien Enden. Dies würde zu einer Verkürzung der Primerbindungsstellen und schließlich zu fehlender Amplifikation der Mimics führen (8).
Durch eine PCR mit 25 Zyklen wurden die Target-Primer in die Actin-DNA eingebaut, so dass definitionsgemäß eine interne Kontrolle hergestellt war.
Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Sedagel-Säulen G-50, die nach Resuspendierung des Säuleninhalts zunächst 2 min lang bei 1100 g zentrifugiert wurden. Nach Austauschen des Röhrchens wurde das zu reinigende PCR-Produkt auf die Mitte der Säule gegeben und 4 min lang bei 700 g zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und die DNA-Konzentration des Eluats bei 260 nm im Photometer vermessen. Die errechnete DNA-Konzentration in µg/ml wurde nach folgender Formel in die Einheit Moleküle/µl umgerechnet (8):

$$\text{Moleküle/µl} = \frac{Konzentration(ng/l) \times 6{,}023 \times 10^{14}/nmol}{2 \times Fragmentlänge \times 313 ng/nmol}$$

$6{,}023 \times 10^{14}$ /nmol	Avogadro-Konstante
313 ng/nmol	durchschnittliches Molekulargewicht einer Base

In der Routine-Diagnostik wurde auf die Verwendung interner Kontrollen verzichtet, da die PCR-Effizienz bei den relativ langen Fragmenten durch Zugabe von Mimics weiter stark reduziert wurde und falsch-negative Ergebnisse nicht auszuschließen waren. Für alle 104 Studienproben aus München wurden allerdings zwei parallele Ansätze für die fünf Pilzspezies getestet, einer mit Mimics in einer Konzentration von 10^4 Molekülen/µl sowie einer ohne Mimics. In allen Proben war ein positives Ergebnis für die interne Kontrolle abzulesen, was die Schlussfolgerung zulässt, dass eine PCR-Inhibition bei Proben aus nativem Patientenmaterial praktisch vernachlässigbar ist.

Identifizierung der PCR-Produkte

Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte entsprechend ihrer Längen im elektrischen Feld. Verwendet wurden 2-3 %ige Agarosegele, wobei sich die Agarosekonzentration nach der Größe der erwarteten DNA-Fragmente richtete. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer suspendiert, durch Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst und in Elektrophoresekammern gegossen. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen des Farbstoffmarkers Blue Juice® versetzt und nach Auftragen in die Geltaschen in 1 x TAE-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 150 V über 60 min hinweg aufgetrennt.
Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 20 min in einem Ethidiumbromidbad (Endkonzentration 0,5 µg/ml in TAE-Puffer) gefärbt und anschließend unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 305 nm mit dem UV-Transilluminator ausgewertet und fotografiert.

PCR-ELISA

Zum spezifischen Nachweis der PCR-Produkte wurde das Prinzip eines kommerziell erhältlichen ELISA-Systems (enzyme-linked immunosorbent assay, enzymgekoppelter Immunnachweis) (PCR ELISA Dig Detection, Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet (Abbildung 4).

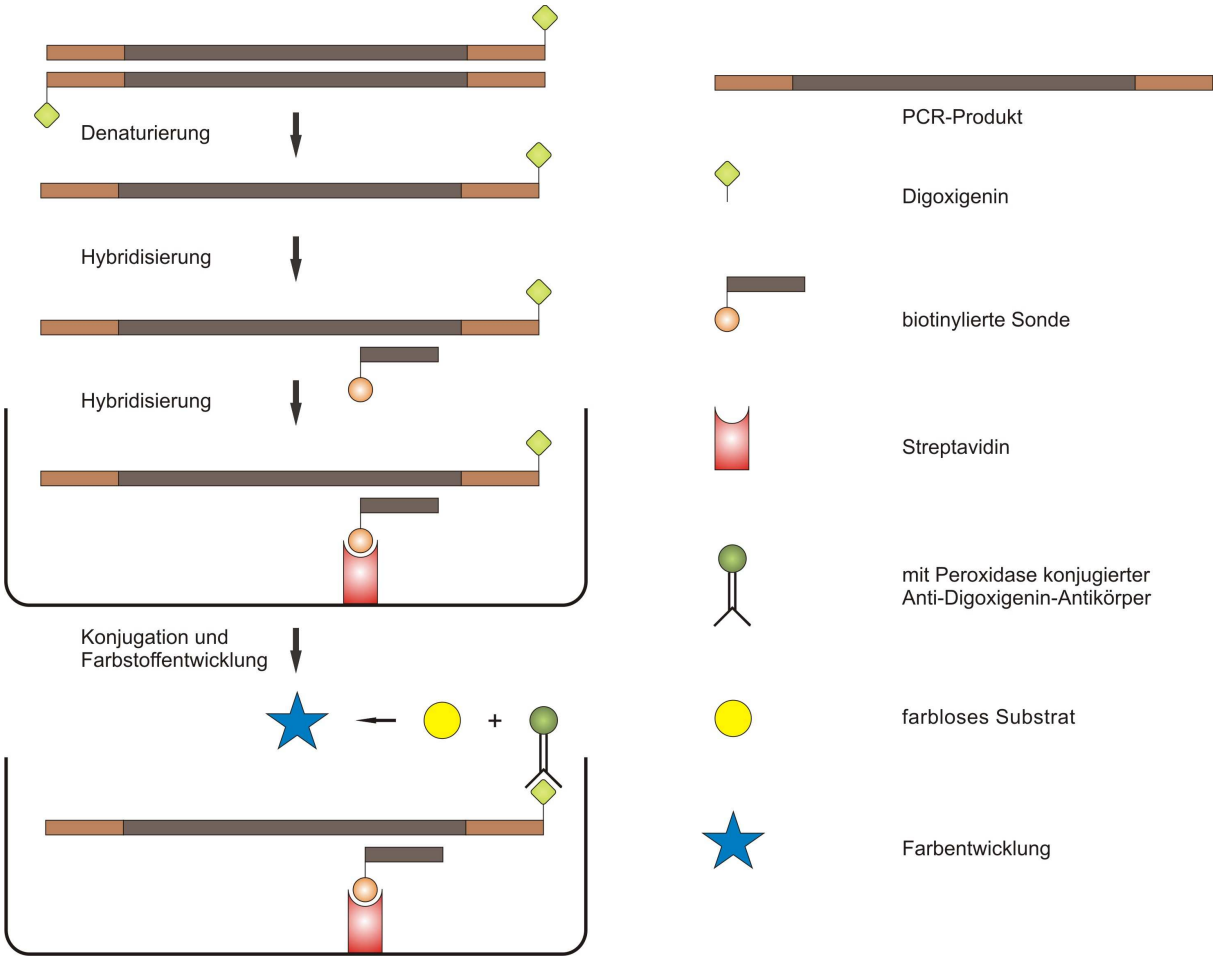

Abbildung 4: Prinzip der ELISA-Reaktion

20 µl PCR-Produkt wurden mit 10 µl Denaturierungslösung alkalisch denaturiert und 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden je Ansatz 100 µl Hybridisierungslösung dazugegeben, die eine für jede Dermatophyten-Spezies spezifische 5'-biotinylierte Sonde (Tabelle 23) in der Endkonzentration von 7,5 µM enthielt. 100 µl dieses Ansatzes wurden in mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatten umpipettiert und mindestens eine Stunde bei 55 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die maximal mögliche Inkubationsdauer betrug drei Stunden. Nach fünfmaligem Waschen mit 125 µl Waschpuffer wurden 100 µl einer Anti-Digoxigenin-Antikörperlösung in einer Konzentration von 10 mU/ml zugegeben. Es erfolgte eine weitere einstündige Inkubation bei 37 °C und ein sich daran anschließender Waschschritt mit fünfmaligem Waschen mit 125 µl Waschpuffer. Für die Farbstoffreaktion wurde nicht das im PCR ELISA Dig Detection Kit enthaltene Originalsubstrat ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolinsulfonat(6)]) verwendet, da die Farbreaktion von hellgrün nach dunkelgrün problematisch in der Auswertung war. Stattdessen wurde der Farbstoff TMB (3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin) eingesetzt, dessen Farbe nach Spaltung durch die Peroxidase von farblos nach blau wechselt und auch ohne Photometer visuell abgelesen werden kann. 100 µl

dieses BM Blue POD-Substrats wurden jeder Probe zugegeben und bei positiver Reaktion führte die Spaltung des chromogenen Anteils zu einer Farbänderung, die bei 370 nm gegen die Referenzwellenlänge 492 nm mit dem ELISA-Reader photometrisch vermessen und zusätzlich photographisch mit einer Digitalkamera dokumentiert wurde (Abbildung 5).

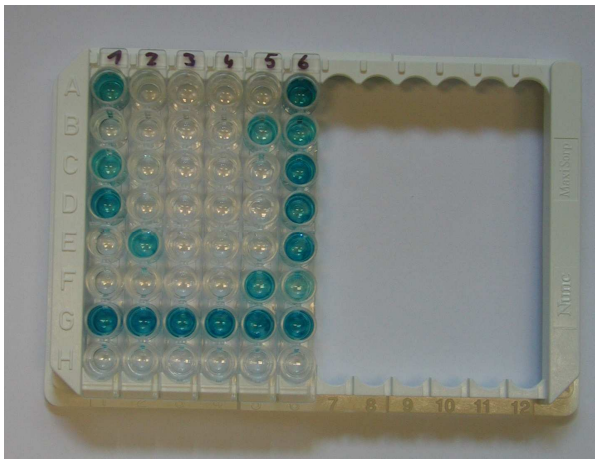

Abbildung 5: PCR-ELISA-Dokumentation

Real-time PCR am LightCycler

Der LightCycler ermöglicht eine Amplifikation der isolierten DNA und die Detektion der Amplifikationsvorgänge in Echtzeit (Real-time PCR). In dieser Arbeit wurde das Prinzip des Fluorescence resonance energy transfer (FRET) verwendet. Hierbei wird die Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor-Fluorophor) strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) über einen Bereich von 10-100 Å übertragen. Dabei überlappen sich Emissions- und Absorptions-spektren der beiden Fluorophore. Als Hybridsonden (LightCycler-Sonden) dienen im Über-schuss zugesetzte und mit Donor- und Akzeptorfluorophoren markierte Oligonukleotide. Die Bindung der Hybridsonden an die Ziel-Sequenz und die damit verbundene Annäherung der Sonden ermöglicht einen FRET. Das Funktionsprinzip des FRET gibt Abbildung 6 wieder.

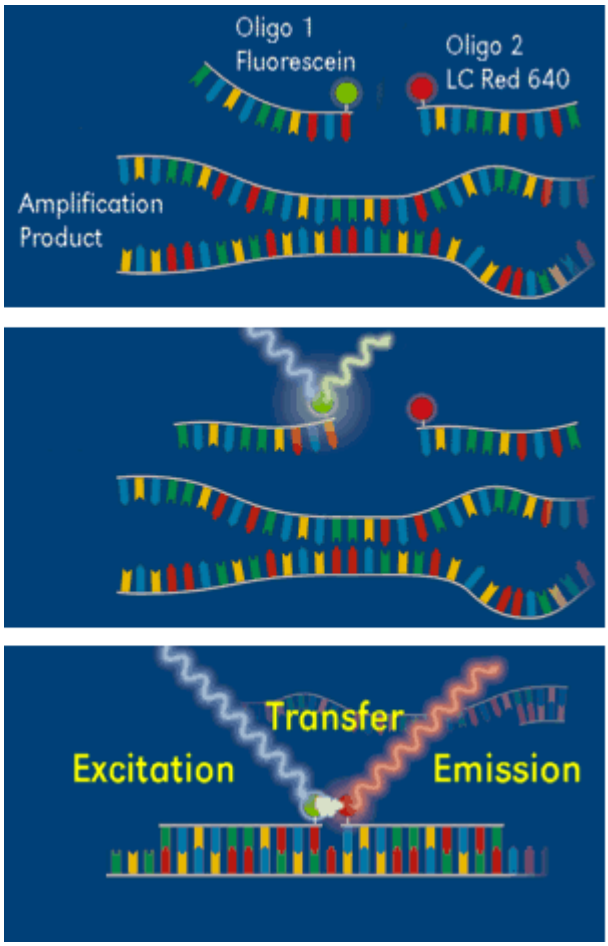

Abbildung 6: Prinzip des Fluorescence resonance energy transfer (nach (109))

Während des Denaturierungsschrittes der Amplifikation liegen die Hybridisierungssonden in ungebundener Form und in räumlicher Distanz zueinander vor, es kann also kein Energietransfer stattfinden. Erst im Verlauf der Annealing-Phase binden sowohl Primer als auch Hybridsonden an die komplementäre Targetsequenz, wodurch sich letztere im Abstand von einem Basenpaar befinden. Durch eine im LightCycler befindliche Lichtquelle wird Fluoreszein, mit dem das 3'-Ende der Donorsonde markiert ist, angeregt und überträgt die Energie strahlungslos auf das Akzeptor-Fluorophor. Dieses emittiert nach Anregung Licht mit einer Wellenlänge von 705 nm, das am Ende der Annealing Phase im Kanal 3 des LightCyclers vermessen wird. Bei der anschließenden Elongation werden die Sonden wieder vom Einzelstrang verdrängt, folglich findet kein FRET mehr statt. Mit zunehmender Zyklenzahl wird mehr Amplifikat gebildet, mehr Sonden können binden und die Fluoreszenzintensität steigt proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produktes.

Schmelzkurvenanalyse:

Im Anschluss an die PCR wird eine Schmelzkurve erstellt. Hierbei wird doppelsträngige DNA denaturiert, indem die Temperatur kontinuierlich von 35 °C auf 85 °C mit einer Geschwindigkeit von 0,2 °C/s erhöht wird. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur kommt es zum Ablösen der Sonden und zum Abbruch des Fluoreszenzsignals. Liegen Fehlpaarungen zwischen den Basen von Target und Sonde vor, schmelzen die Sonden bereits bei niedrigeren Temperaturen vom Amplifikat ab und der Schmelzpunkt ist verschoben. Zum vereinfachten Ablesen der Schmelzpunkte wird von der LightCycler-Software die erste negative Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen.

Die Real-time PCR wurde in einem LightCycler 1.0 mit einem Reaktionsansatz von 10 µl je Probe durchgeführt.

Reagenz	**Volumen [µl]**	**Endkonzentration**
LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes^{PLUS}	2	1x
Upstream Primer (20 µM)	1	2,0 µM
Downstream Primer (20 µM)	1	2,0 µM
Fluorescein Sonde (2,0 µM)	1	0,2 µM
LC-Red-705 Sonde (2,0 µM)	1	0,2 µM
ddH_2O	1	
DNA	3	

Tabelle 20: Reaktionsansatz für die Real-time PCR am LightCycler

Reaktionsschritt		**Temperatur [°C]**	**Dauer [s]**
Initiale Denaturierung		95	300
Amplifikation	Denaturierung	95	5
	Annealing	58	5
	Elongation	72	13
Schmelzkurve	Initiale Denaturierung	95	0
	1. Teil	35	30
	2. Teil	35-85, Slope 0,1 °C/s	
Zyklenanzahl: 40		Gesamtdauer: 35 min	

Tabelle 21: Temperaturparameter für die Real-time PCR am LightCycler

Folgende Primer- und Sondenpaare wurden für die Dermatophyten-Identifizierung am Light-Cycler entwickelt:

Primer	Ausrichtung	Nukleotidsequenz (5’ → 3’)
A1	U	CAG CGG AAG GTT TTG TAC AC
A4	D	ATA TAA CGA GCA CTG GC
A5	U	CAA CGA AAA GTC CTA TAT AC

Tabelle 22: Primer für die Real-time PCR am LightCycler

U: Upstream-Primer

D: Downstream-Primer

Sonde	Farbstoff-Markierung	Nukleotidsequenz (5’ → 3’)
TM1	3’-FL	GCC TGG CTC AAA CAT TCG TC
TM-705	5’-Red-705	GGT CAA ATA ACA TCA ATT GCT

Tabelle 23: Mit LightCycler-Farbstoffen markierte Sonden für die Real-time PCR

Sequenzierung

Die Sequenzierung der LightCycler-Amplifikate von *T. rubrum, T. interdigitale* und *M. canis* erfolgte durch die Firma MWG (MWG-Biotech, Ebersberg). Für die Probenvorbereitung wurde hierfür die DNA von Referenzkulturen von *T. rubrum* (ATCC 10218), *T. interdigitale* (ATCC 28939) und *M. canis* (330.05) isoliert und eine PCR im Thermocycler unter Bedingungen, wie sie auch für die PCR-ELISA-Methode angewandt wurden, durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem QIAquick Purification Kit nach den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt, die DNA-Konzentration photometrisch vermessen und je Primer 50 ng (20 ng DNA pro 100 Basen) DNA als luftgetrocknetes Pellet an MWG zur Sequenzierung eingesandt.

Statistische Auswertung und benutzte Software

Die erhaltenen Ergebnisse der oligozentrischen Studie aus München, Neu-Ulm und Tübingen wurden mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS 14.0 ausgewertet und in Excel XP graphisch dargestellt. Abbildungen der Agarose-Gelbilder wurden mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet.

3. ERGEBNISSE

Methoden-Evaluierung

Etablierung eines DNA-Extraktionsverfahrens

Im Rahmen der Evaluierung eines Extraktionsverfahrens von genomischer Dermatophyten-DNA wurden acht verschiedene, kommerziell erhältliche Nukleinsäure-Extraktionskits miteinander verglichen. Die DNA-Isolierung erfolgte dabei mit jedem Kit aus 20 mg Material von jeweils 10 Pilzkulturen (Tabelle 24). Die isolierte DNA wurde anschließend 1:100 verdünnt, um eine ausreichende Differenzierung in der Nachweisbarkeit der unterschiedlichen Kits zu erhalten. Die Detektion der PCR-Amplifikate erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Extraktions-Kit	Nachweisbar 1:100
Chemagic	1
Dynabeads	0
Easy Pure	10
Invisorb	7
Nucleo Spin	8
Puregene	10
QIAamp	10
S&S	3

Tabelle 24: Getestete DNA-Extraktionskits

Alle Extraktionskits verwendeten zum Zellaufschluss einen Lyse-Puffer unter Zugabe eines lysierenden Enzyms wie Lyticase oder Proteinase K. Unterschiede ergaben sich erst in der DNA-Gewinnung: Beim Easy Pure- und Puregene-Kit wurde die DNA durch unterschiedliche Salzkonzentrationen der Puffer ausgefällt, der S&S-Elu-Quick-Kit verwendete zusätzlich noch Glasmatrices zur Steigerung der Elutionseffizienz. Mittels magnetischer Partikel, die mit der freigesetzten DNA einen Komplex bilden, wurde die DNA beim Chemagic- wie auch beim Dynabeads-Kit separiert. Die komfortabelste Technik ist sicherlich die Anwendung von Mini-Prep-Säulen auf Silikat-Matrix-Basis, wie sie beim Invisorb-, QIAamp- und Nucleo Spin-Kit eingesetzt wurden.

Der Vergleich erbrachte für die Easy Pure-, Puregene- und QIAamp-Isolierungskits mit jeweils 10 positiv detektierten Pilzkulturen das beste Ergebnis. Die Entscheidung fiel zu

Gunsten des aufgrund der Verwendung der Säulentechnik einfach zu handhabenden QIAamp-DNA Mini Kits aus, das zudem in der Hautarztpraxis Bezold/Gottlöber bereits für die routinemäßige Isolierung von DNA aus Patientenproben lange etabliert war.

Charakterisierung der Dermatophyten mittels PCR am Thermocycler

Dermatophyten-spezifische PCR

Zunächst wurde das Primerpaar TR1 und TR2 (17) an nativen Patientenproben getestet, um eine pilzspezifische PCR zu etablieren und daraus mittels Restriktionsenzymen eine Dermatophyten-spezifische PCR zu entwickeln.

Für *T. rubrum, T. interdigitale, T. mentagrophytes, T. verrucosum, T. violaceum* und *M. canis* wurden charakteristische Amplifikationsprodukte mit einer Größe von 581 bp erhalten (Abbildung 7). Da jedoch Kontrollen mit genomischer Human-DNA entgegen veröffentlichter Literatur (3, 17) immer wieder schwache Banden in der Gelelektrophorese zeigten, wurde eine Weiterentwicklung dieses Systems verworfen und weitere Primer auf die Verwendbarkeit als Dermatophyten-spezifische bzw. Gattungs- oder Spezies-spezifische Primersysteme hin untersucht.

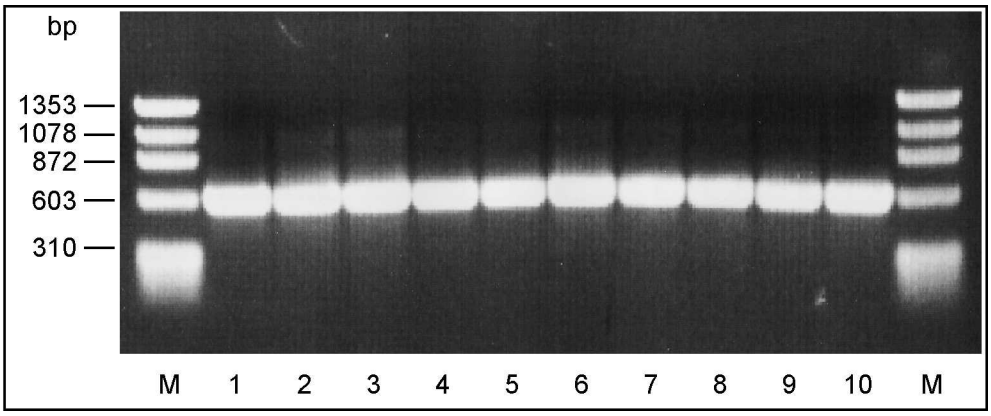

Abbildung 7: PCR-Amplifikate mit dem Primerpaar TR1/TR2, Proben aus Dermatophyten-Kulturen, Agarosegel 2,5 %

M: Molekulargewichtsmarker; 1-3: *T. rubrum*; 4, 5: *T. interdigitale*; 6: *T. mentagrophytes*; 7: *T. violaceum*; 8: *T. verrucosum*; 9, 10: *M. canis*.

AP-PCR

Im Rahmen einer AP-PCR wurde zwei Primer-Dekamere (OPAA11 und OPD18) (81) sowohl an Pilzkulturen als auch an Patientenproben getestet. Spezifische Bandenmuster zeigten sich für *T. rubrum* und *T. interdigitale* aus Kulturen im Vergleich mit Referenzstämmen. Allerdings ist die AP-PCR nicht für den Einsatz an nativem Patientenmaterial geeignet, da auch die Human-DNA ein spezifisches Bandenmuster liefert, das sich mit dem der Dermatophyten-DNA überlagert und aufgrund der Komplexität der erhaltenen Muster nicht mehr reproduzierbar auswerten lässt.

Fingerprint-PCR

Auch die Fingerprint-PCR konnte nur zur orientierenden Charakterisierung verschiedener Spezies aus Pilzkulturen herangezogen werden. Mittels der beiden Primer AP3 (140) und M13 (59) war es zwar möglich, einzelne *T. rubrum*- und *T. interdigitale*-Kulturen zu identifizieren, einem weiteren Einsatz im Routinelabor stand jedoch die mangelnde Reproduzierbarkeit und Anwendbarkeit für native Patientenproben entgegen, ferner die Schwierigkeit, einzelne Bandenmuster, die Varianten-spezifisch waren, den entsprechenden Spezies zuzuordnen.

Charakterisierung von *T. rubrum*

Charakterisierungsversuche von *T. rubrum*-Stämmen aus Pilzkulturen erfolgten mit den Primer-Systemen TRS1 (TrNTSF-2 und TrNTSR-4) und TRS2 (TrNTSR-1 und TrNTSC-1) (61). Für TRS1 konnten charakteristische Bandenmuster mit sich wiederholenden Elementen im Abstand von jeweils 200 bp nachgewiesen werden, wie sie für die TRS-1-Region typisch sind (61). Hierdurch wurde bei einem Patienten mit *T. rubrum*-Syndrom nach Kick und Korting (72) eindeutig belegt, dass alle fünf Proben von verschiedenen Körperstellen (Rücken, Bein rechts, Oberschenkel links, Fußsohle, Zehennagel) einer einzigen Variante von *T. rubrum* zuzuordnen sind (Abbildung 8).

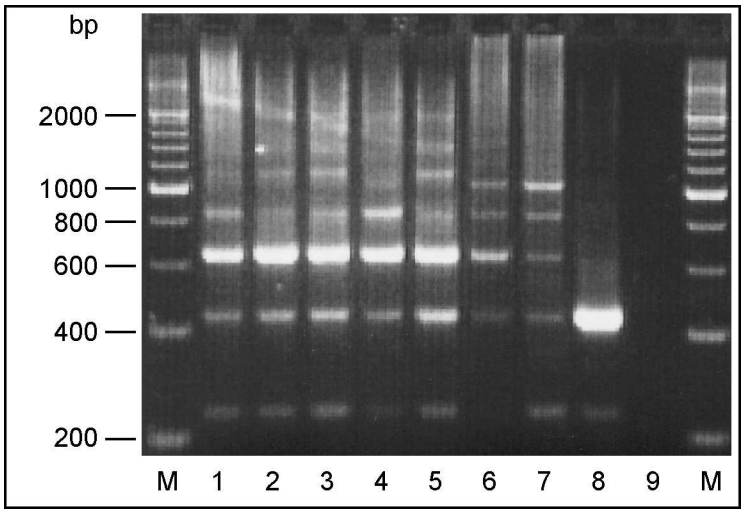

Abbildung 8: PCR-Fingerprintingprofile: *T. rubrum*-Charakterisierung der TRS1-Region mit dem Primerpaar TrNTSF-2 und TrNTSR-4, Agarosegel 2 %

M: Molekulargewichtsmarker; 1-5: *T. rubrum*-Syndrom-Proben (5894.06) nach Wachstum auf Kulturen (1: Rücken, 2: Bein rechts, 3: Oberschenkel links, 4: Fußsohle, 5: Zehennagel); 6-8: *T. rubrum*-Referenzstämme (6: ATCC 10218, 7: 5584, 8: 5738.05); 9: Negativkontrolle.

Die Amplifizierung mit dem TRS2-Primerpaar erbrachte für verschiedene *T. rubrum*-Stämme eine einheitliche PCR-Bande bei 502 bp, was somit nicht zu einer zusätzlichen Charakterisierung einzelner *T. rubrum*-Varianten beitragen konnte.

Sowohl TRS1 als auch TRS2-Primer sind nicht für eine Speziesdifferenzierung geeignet, auch beschränkt sich der Einsatz aus oben genannten Gründen bei dieser Fingerprint-Methode auf Pilzisolate aus Kulturen.

RFLP

Unter Zuhilfenahme des Primer-Programms „Primer3“ wurde ein in der ITS-Region amplifizierendes Primerpaar ITS1 und ITS2 entworfen. In der PCR konnte im Agarosegel für *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *T. violaceum*, *T. terrestre*, *M. canis* und *E. floccosum* jeweils ein 220 bp großes Amplifikat nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktion mit Human-DNA sowie DNA von Hefen (*C. albicans* und *C. parapsilosis*) wurde nicht beobachtet. Die anschließende Restriktionsanalyse mit dem Enzym *Hae*III ermöglichte die Unterscheidung von *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *M. canis* von den anderen untersuchten Dermatophyten: *T. rubrum* wies ein etwa 50 bp-Fragment, *T. interdigitale* ein 50 bp- und 100 bp-Fragment, sowie *M. canis* ein 40 bp- und 120 bp-Fragment auf (Abbildung 9).

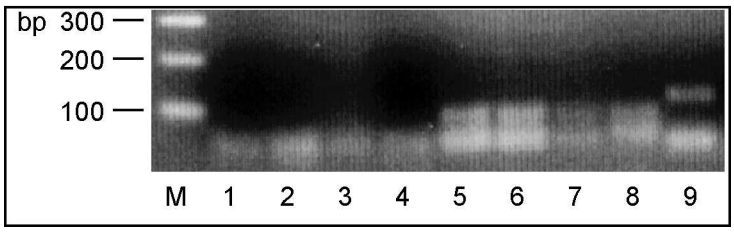

Abbildung 9: RFLP-Profile nach PCR mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 und anschließender Restriktionsenzymanalyse mit *Hae*III, Proben aus Dermatophyten-Kulturen, Agarosegel 3 %
M: Molekulargewichtsstandard; 1-4: *T. rubrum*; 5-8: *T. interdigitale*; 9: *M. canis*.

Etablierung der PCR-ELISA-Technik

Identifizierung fünf gängiger Dermatophyten-Spezies

Um eine reproduzierbare molekularbiologische Methode zum Nachweis von Dermatophyten in der mykologischen Routinediagnostik zu etablieren, wurde eine PCR-ELISA-Methode entwickelt, die es ermöglicht, folgende fünf Dermatophyten-Spezies nachzuweisen:
T. rubrum, *T. interdigitale*, *T. violaceum*, *M. canis* und *E. floccosum*.
Die Primersequenzen stammen aus der Arbeit von Kanbe et al. (65), in der sie allerdings in einer sogenannten „nested-PCR“ eingesetzt wurden und keiner Dermatophyten-Spezies zugeordnet waren. Nach Vergleich der Primersequenzen mit den Topoisomerase-II-Sequenzen der fünf Dermatophyten-Spezies (AB096064, AB096065, AB096066, AB096067, AB096069) wurde eine Zuordnung vorgenommen und für jedes der fünf spezifischen Amplifikate eine Spezies-spezifische Sonde entwickelt.
Jedes Primerpaar ergab für jede zugehörige Dermatophyten-Spezies ein Amplifikat spezifischer Länge (Abbildung 10).

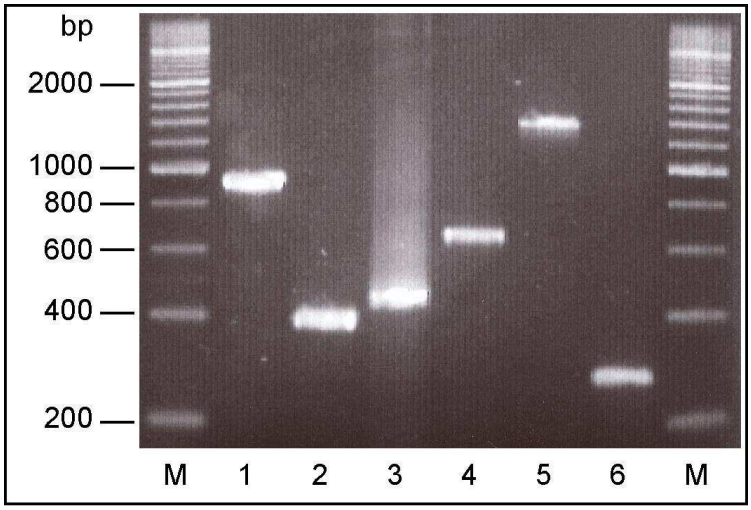

Abbildung 10: PCR-Produkte mit Spezies-spezifischen Primern, Agarosegel 3 %

M: Molekulargewichtsmarker
1: *T. rubrum* 923 bp
2: *T. interdigitale* 390 bp
3: *T. violaceum* 419 bp
4: *M. canis* 637 bp
5: *E. floccosum* 1334 bp
6: β-Globin 268 bp

Sämtliche PCR-Reaktionen konnten bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C parallel im Thermocycler durchgeführt werden. Ebenso identisch waren die ELISA-Hybridisierungstemperaturen mit 55 °C für die Hybridisierung der Sonden und 37 °C für die Hybridisierung der Anti-Digoxigenin-Antikörperlösung für alle Dermatophyten-Spezies.
Bei einigen Sonden war es notwendig, verschiedene Nukleotid-Sequenzen zu testen, um eine ausreichende Sensitivität und Spezifität zu erreichen.

Sensitivität und Spezifität

Sensitivitätsvergleich Gelelektrophorese-ELISA
In einer Verdünnungsreihe wurde die Sensitivität des PCR-ELISA-Assays ermittelt. Genomische DNA aus isolierten *T. rubrum*-Kulturen wurde photometrisch vermessen und der Gehalt in 10-er Verdünnungen von 0,5-500 µg/ml eingestellt.
Im Agarose-Gel zeigte sich die Nachweisgrenze bei 10 pg genomischer *T. rubrum*-DNA (Abbildung 11), mit Hilfe des ELISA waren sogar noch 1 pg DNA nachweisbar.

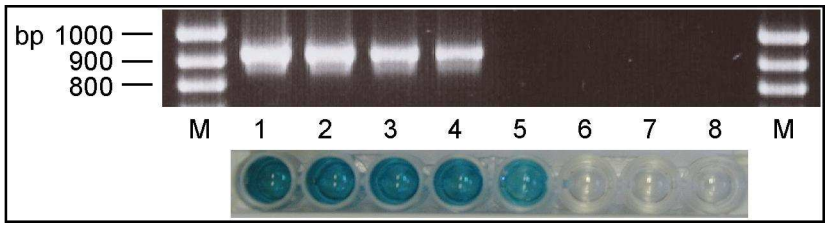

Abbildung 11: Sensitivitätsvergleich Agarose-Gelelektrophorese mit PCR-ELISA-Assay, Verdünnungsreihe mit DNA aus *T. rubrum*-Kultur

M: Molekulargewichtsmarker;

1: 10 ng; 2: 1 ng; 3: 100 pg; 4: 10 pg; 5: 1 pg; 6: 0,1 pg; 7: 0,01 pg; 8: Negativkontrolle.

Spezifität

Jedes Primer-/Sondenpaar wurde jeweils an drei Positivkontrollen jeder nachzuweisenden Dermatophyten-Spezies getestet. Keine der durchgeführten Kreuzreaktionen war falsch-positiv (Abbildung 12).

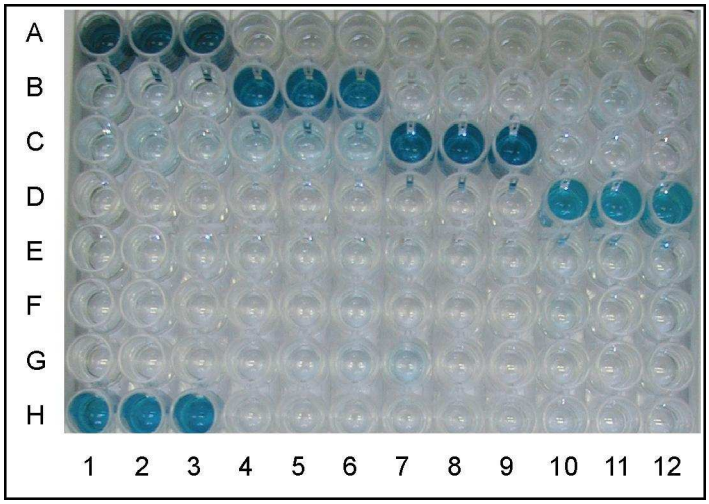

Abbildung 12: Kreuzreaktionsbestimmung, Dreifachbestimmungen

Reihe A: *T. rubrum*-Primer	A-F	1-3:	Positivkontrolle *T. rubrum*
Reihe B: *T. interdigitale*-Primer		4-6:	Positivkontrolle *T. interdigitale*
Reihe C: *T. violaceum*-Primer		7-9:	Positivkontrolle *T. violaceum*
Reihe D: *M. canis*-Primer		10-12:	Positivkontrolle *M. canis*
Reihe E: *E. floccosum*-Primer			
Reihe F: β-Globin-Primer			

Reihe G: Positivkontrolle *E. floccosum*; Primer: 1-3 *T. rubrum*, 4-*6 T. interdigitale*, 7-*9 T. viol*., 10-12 *M. canis*

Reihe H: Positivkontrolle *E. floccosum*; Primer: 1-3 *E. floccosum*, 4-6 β-Globin

Etablierung der LC-Technik

Der spezifische Nachweis einzelner Dermatophyten-Spezies mittels sequenzspezifischer Sonden, wie sie beim PCR-ELISA-Assay zum Einsatz kamen, ließ sich in abgewandelter Form auf die Real-time PCR am LightCycler übertragen. Zur Generierung von sequenzspezifischen Fluoreszenzsignalen während der PCR stehen verschiedene Formate zur Verfügung, die das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) nutzen:

- Hybridisierungssonden
  Bei der unmittelbar benachbarten Hybridisierung zweier terminal markierter Sonden auf der Zielsequenz ist ein Energietransfer vom angeregten Donor- auf das Akzeptorfluorophor möglich. Ein Vorteil gegenüber Hydrolysesonden ist ihr modularer Aufbau und die besondere Eignung für eine Genotypisierung. Nachteilig kann sich der längere Sequenzbereich auswirken, der durch beide Sonden abgedeckt werden muss (127).

- Hydrolysesonden
  Die auch als *Taq*Man-Sonden bezeichneten einzelsträngigen Oligonukleotide, die mit einem Reporterfluorophor und einem Quencher in einem Abstand von 3-30 Basen markiert sind, werden im Zuge der Amplifikation durch die endonukleolytische Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase hydrolysiert, so dass das Fluorophor räumlich vom Quencher getrennt wird und bei Anregung fluoresziert. Da *Taq*Man-Sonden sehr sensibel auf einzelne Fehlbasen sind, lassen sie sich nicht zur Genotypisierung heranziehen, da sonst ein „Nichtsignal“ einem Genotypus zugeordnet werden müsste (127).

- Molecular Beacons
  Diese Sonden tragen an ihren Enden selbstkomplementäre Sequenzen und ein Fluorophor/Quencher-Paar, so dass sie in Abwesenheit einer komplementären Sequenz in einer charakteristischen Stem-Loop-Struktur vorliegen. Erst mit einer entsprechenden Zielsequenz wird diese Struktur geöffnet und liefert ein Fluoreszenzsignal (139). Die hohe Sensibilität der Molecular Beacons gegenüber Fehlpaarungen ist ebenfalls wenig geeignet für Genotypisierungen.

- Sunrise

  Sunrise-Primer sind vergleichbar mit Molecular Beacons, da sie am 5'-Terminus selbstkomplementäre Sequenzabschnitte aufweisen, die eine Haarnadel-Struktur ausbilden, und mit einem Fluorophor sowie einem Quencher markiert sind. Die 3'-terminale Sequenz ist komplementär zur Zielsequenz und dient als Primer. Sunrise Primer werden in das PCR-Produkt eingebaut, liegen dadurch in geöffneter Form vor und fluoreszieren nach Anregung. Problematisch sind Primer-Dimere sowie die Bildung von unspezifischen Produkten.

- Scorpion

  Diese Variante der Sunrise-Primer unterbindet die Bildung fluoreszierender Primer-dimere oder unspezifischer Produkte sowohl durch eine Verlängerung des Gegen-stranges in den Primer hinein als auch durch eine interne Hexethylenglykolgruppe. Die mangelnde Eignung für Genotypisierungen wirkt sich allerdings limitierend auf den Einsatz für Spezies-Bestimmungen aus.

Zur Identifizierung einzelner Dermatophyten-Spezies wurde schließlich das Format der Hybridisierungssonden verwendet, da es sich am besten für Spezies-Identifizierungen eignet.
Zunächst wurden verschiedene Primer-/Sonden-Kombinationen getestet, um zum einen eine ausreichende Spezies-Spezifität und Sensitivität zu erlangen, zum anderen unspezifische Produkte sowie Primer-Dimere und Primer-Sonden-Interaktionen zu vermeiden und eine genügend hohe Trennschärfe zwischen den Schmelzpunkten der einzelnen Spezies zu erreichen.
Die Zielsequenzen der Amplifikate liegen wie beim PCR-ELISA im Topoisomerase-II-Gen der Dermatophyten. Nach dem Alignment aller in der Gendatenbank des „European Bioinformatics Institute" (36) verfügbaren Topoiomerase-II-Sequenzen von Dermatophyten wurde eine Region in den Sequenzen gewählt, die genügend Basenunterschiede aufweist, um eine Spezies-Trennung zu ermöglichen.

Identifizierung von *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *M. canis*

Mit Hilfe des Primerpaars A1/A4 (Tabelle 22) und des Sondenpaars TM1/TM-705 (Tabelle 23Tabelle 19) konnten *T. rubrum* und *T. interdigitale* in einem einzigen Lauf mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse identifiziert werden. Die Sondensequenz ist hierbei komplementär zur entsprechenden *T. interdigitale*-Sequenz (Abbildung 13), weist allerdings fünf Basenunterschiede zur *T. rubrum*-Sequenz auf.

Die Schmelztemperatur des *T. interdigitale*-Amplifikats liegt deshalb mit 58,5 °C deutlich höher als die entsprechende Temperatur des *T. rubrum*-Amplifikats mit 47,5 °C. Diese Differenz von 11 °C lässt sich durch die geringere Bindungsaffinität der Hybridisierungssonde an die *T. rubrum*-Sequenz im Vergleich zur *T. interdigitale*-Sequenz erklären, die aus den fünf Basenunterschieden resultiert (Abbildung 13).

```
R 5′-TTGGTCTGGCTCAAACCTTCGTCGGCTCAAACAACATCAATTGTTGG-3′
I 5′-TTGGCCTGGCTCAAACATTCGTCGGGTCAAATAACATCAATTGCTTGG-3′
        |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sonde   GCCTGGCTCAAACATTCGTC GGTCAAATAACATCAATTGCT
```

Abbildung 13: Ausschnitt aus dem Topoisomerase-II-Gen für *T. rubrum* und *T. interdigitale*: Sondensequenz-Bindungsstelle mit Darstellung der Basenübereinstimmungen

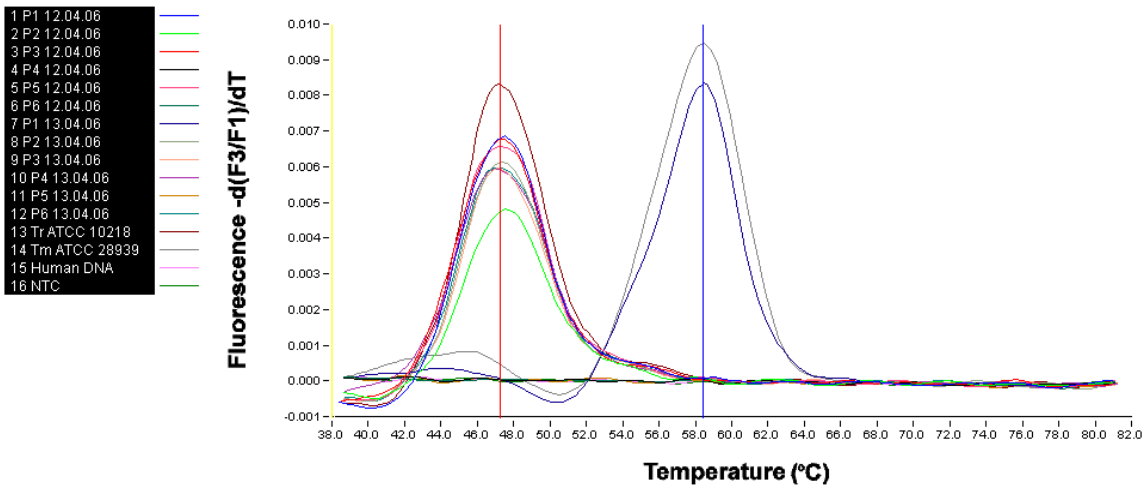

Abbildung 14: Dermatophyten-Diagnostik mittels Schmelzkurvenanalyse am LightCycler, Primer A1 und A4

Peak bei T_m=47,5 °C: *T. rubrum*

Peak bei T_m=58,5 °C: *T. interdigitale*

Nr. 1-12: Patientenproben im Rahmen der oligozentrischen Studie; Nr. 13: *T. rubrum*-Positivkontrolle; Nr. 14: *T. interdigitale*-Positivkontrolle; Nr. 15: genomische Human-DNA; Nr. 16: NTC (no template control, Negativkontrolle)

Eine mögliche Doppelbesiedlung mit T. rubrum und T. interdigitale kann problemlos anhand zweier auftretender Peaks detektiert werden, was Proben mit zu Versuchszwecken vermischter T. rubrum- und T. interdigitale-DNA zeigten.

Für *M. canis* konnte mit diesem Primer-/Sonden-Set kein Signal erhalten werden, da der Upstream-Primer A1 nicht für die *M. canis*-Sequenz geeignet war. Nach Austausch des Primers A1 gegen den neuen Upstream-Primer A5 (Tabelle 22Tabelle 18) konnte in einer separaten Real-time PCR der molekularbiologische Nachweis auch für *M. canis* mittels LightCycler etabliert werden. Der Downstream-Primer sowie die Hybridisierungssonden blieben dabei identisch mit den verwendeten aus dem *T. rubrum*/*T. interdigitale*-Assay. Mit 46 °C lag die durchschnittliche Schmelztemperatur für *M. canis* um 1,5 °C niedriger als für *T. rubrum*, was durch den Austausch einer weiteren Base in der *M. canis*-Sequenz bedingt war und die Sonden-Sequenz in immerhin sechs Nukleotiden mit der *M. canis*-Zielsequenz differierte (Abbildung 15).

```
R 5′-TTGGTCTGGCTCAAACCTTCGTCGGCTCAAACAACATCAATTGTTTGG-3′
I 5′-TTGGCCTGGCTCAAACATTCGTCGGGTCAAATAACATCAATTGCTTGG-3′
M 5′-TCGGCCTTGCTCAAACCTTTGTCGGCTCAAACAACATCAACTGCTTAG-3′
        |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sonde   GCCTGGCTCAAACATTCGTC GGTCAAATAACATCAATTGCT
```

Abbildung 15: Ausschnitt aus Topoisomerase-II-Gen für *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *M. canis*: Sondensequenz-Bindungsstelle mit Darstellung der Basenübereinstimmungen

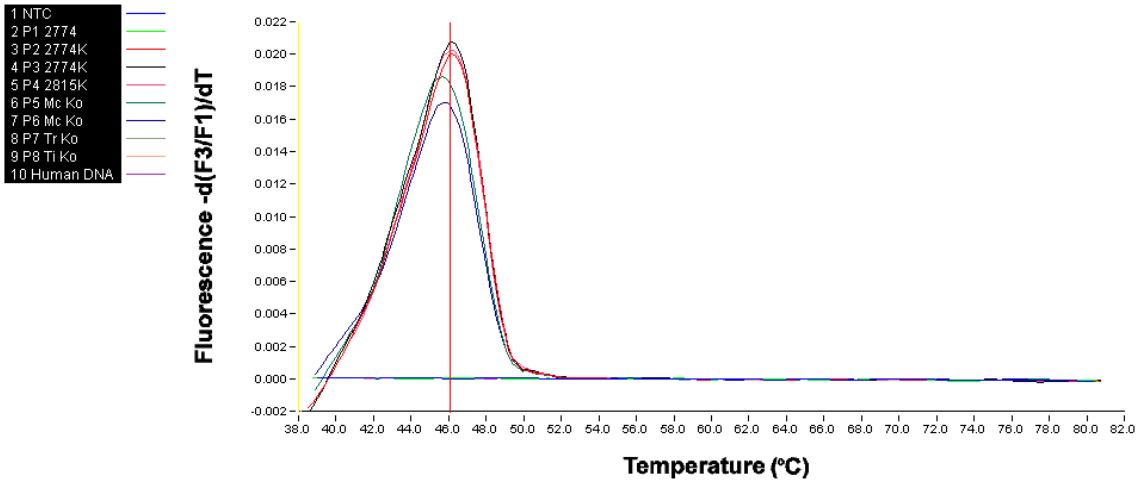

Abbildung 16: Dermatophyten-Diagnostik auf *M. canis* mittels Schmelzkurvenanalyse am LightCycler, Primer A4 und A5

1: NTC; 2-4: Patientenproben; 6, 7: Positivkontrollen *M. canis* (330.05, 589.05); Positivkontrollen *T. rubrum* (ATCC 10218, 5584.06); 10: Human DNA.

Allgemein wird eine Differenz von 4-5 °C zwischen zwei Schmelzkurven-Peaks eines PCR-Laufes gefordert, um eine saubere Trennung zwischen zwei Spezies vornehmen zu können (108). Weiters spricht die unüberschaubare und nicht mehr händelbare Komplexität von Primer-Dimeren und Primer-Sonden-Interaktionen gegen den Einsatz verschiedener Primer-/Sonden-Kombinationen in einer einzigen PCR-Reaktion. Für *T. rubrum*/*T. interdigitale* sowie *M. canis* wurden deshalb zwei getrennte PCR-Ansätze etabliert, die jedoch in einem einzigen LightCycler-Lauf parallel unter gleichen PCR-Bedingungen durchgeführt werden konnten.

Einige strukturelle Regeln, wie sie in der Literatur zum Sondendesign empfohlen wurden (107), stellten sich als sinnvoll heraus, andere wiederum waren nicht relevant, was durch das gute Funktionieren des selbst entwickelten Primer-Sonden-Systems gezeigt werden konnte:

So wurden komplementäre Sequenzen, die zur Hybridisierung von Primern und Sonden untereinander führen könnten, sowie selbstkomplementäre Strukturen innerhalb einer Sonde und Palindrome vermieden. Auch ausgedehnte repetitive und monotone Sequenzen sind ungünstig zu bewerten, da sie keinen definierten Bindungsort geben und zu einer Verteilung der Sonde über verschiedene Positionen führen. Sehr GC-reiche Sequenzen erhöhen die Bindungsaffinität, woraus hohe Schmelztemperaturen resultieren. Hochschmelzende Sonden jedoch inhibieren wiederum die PCR, indem sie die Extension verhindern und durch die Polymerase von der Zielsequenz nicht getrennt werden können. Mit Schmelztemperaturen zwischen 46 °C und 58,5 °C wurde das empfohlene Maximum von 80 °C deutlich unterschritten und eingehalten.

Eine weitere Richtlinie für das Primer- und Sonden-Design betrifft das Verhältnis der Schmelztemperaturen zueinander: Die Schmelztemperaturen (T_m) der Sonden sollten zwischen 5 °C und 10 °C über denen der Primer liegen, um ein ausreichend hohes Fluoreszenzsignal zu erhalten, da zwei Sonden mit der Bindung von nur einem Primer auf einem Strang konkurrieren und daher deutlich fester binden müssen. Die thermodynamisch errechneten Schmelztemperaturen T_m liegen bei den Primern bei 55,5 °C (A1), 45,7 °C (A4) und 43,3 °C (A5), bei den Sonden bei 59 °C (FL) und 51,5 °C (Red-705). Insbesondere die hohe Schmelztemperatur des Upstream-Primers A1 mit 55,5 °C ist auffällig und entspricht nicht den empfohlenen Regeln. Allerdings stellte sich nach der Sequenzierung der untersuchten Target-Sequenzen ein Fehler in der veröffentlichten Gensequenz an Position 11 der Primer-Bindungsstelle heraus (siehe 0): Der bereits vor der Sequenzierung etablierte Primer weist somit eine Fehlbase im Bereich der Zielsequenz auf und die Schmelztemperatur ist dadurch mit einer errechneten thermodynamischen T_m von 52 °C deutlich erniedrigt. Die

nicht ganz den Empfehlungen entsprechenden T_m-Verhältnisse spiegeln die Probleme bei der Entwicklung von funktionierenden Hybridisierungs-Assays wider: Nicht immer führen die theoretischen Regeln zum gewünschten Erfolg, vielmehr ist ein empirisches Austesten verschiedenster Primer- und Sonden-Paare unerlässlich.

Die Auswahl der Sondenfarbstoffe beschränkt sich bei Verwendung des LightCyclers 1.0 auf LC-Red 640 und LC-Red 705. Mit letzterem konnten in den Versuchsreaktionen etwas höhere Fluoreszenzsignale erhalten werden, weshalb die Entscheidung auf den Sondenfarbstoff LC-Red 705 fiel.

Bei der Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten stellen partiell überlappende Emissionsspektren der einzelnen Fluorophore ein Problem dar. Die in einem Kanal gemessene Signalintensität ist hierbei nicht ausschließlich durch die Fluoreszenz des dazugehörigen Fluorophors bedingt, dessen Emissionsmaximum im Detektionsbereich des Kanals liegt, vielmehr tragen die Emissionen anderer Fluorophore zum gemessenen Signal bei, was als „Übersprechen“ oder „crosstalk“ bezeichnet wird. Diese durch das Übersprechen bedingten Signalanteile können mittels Farbkompensationsmessungen mit dem „Roche LightCycler Color Compensation Set“ bestimmt und fortan herausgerechnet werden.

Da jedoch nur ein Sondenfarbstoff je Reaktion zum Einsatz kam, war ein Übersprechen nur zwischen den beiden Farbstoffen Fluorescein, mit dem die Anregungssonde markiert ist, und LC-Red 705 möglich. Die Emissionsmaxima dieser beiden Fluorophore liegen mit 530 nm und 705 nm deutlich auseinander, der Fehler durch einen crosstalk ist somit vernachlässigbar (107), weshalb auf eine teure Farbkompensationsmessung verzichtet wurde.

Ein weiteres Problem wurde während der Etablierung des Hybridisierungssonden-Assays beobachtet: Zunächst wurden sehr hohe Zyklenzahlen von 45 Zyklen während der PCR verwendet, wobei es zu einem deutlichen Hook-Effekt in der Plateau-Phase der Amplifikation kam. Das Fluoreszenzsignal fällt hierbei nach einem annähernd exponentiellen Anstieg wieder ab, ein Plateau-ähnlicher Verlauf der Amplifikationskurve kommt nicht mehr zustande. Zu erklären ist dies mit einer Hydrolyse der Sonden durch die endonukleolytische Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase, die während der PCR parallel mit der Produktmenge zunimmt und Ausmaße zwischen 20 und 70 % annehmen kann (139). Im weiteren Verlauf wurden schließlich nur noch 35 Zyklen angesetzt, um die Sonden-Hydrolyse zu minimieren und dadurch höhere Schmelzkurvenpeaks zu erhalten.

Sensitivität und Spezifität

Für alle drei mit dem LightCycler nachweisbaren Dermatophyten-Spezies wurde eine Verdünnungsreihe mit genomischer DNA auf die kleinste noch nachzuweisende Menge hin untersucht. Sie lag für *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *M. canis* bei jeweils 0,1 ng/ml, das entspricht unter Berücksichtigung des in der PCR eingesetzten Volumens einer Menge von 0,1 pg DNA (Abbildung 17).

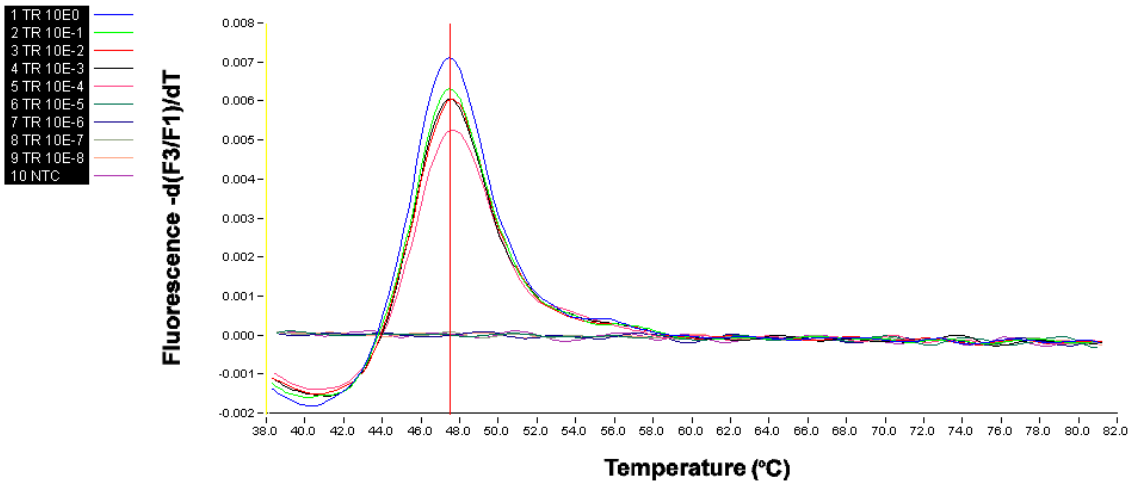

Abbildung 17: Sensitivitätsbestimmung, Verdünnungsreihe am Beispiel *T. rubrum*

Proben 1-10: 1 ng - 10^{-1} ng - 10^{-2} ng - 10^{-3} ng - 10^{-4} ng - 10^{-5} ng - 10^{-6} ng - 10^{-7} ng - 10^{-8} ng - NTC

Kreuzreaktionen wurden sowohl mit dem Primerpaar A1/A4 für *T. rubrum* und *T. interdigitale* als auch mit dem Primerpaar A4/A5 für *M. canis* ausgetestet: Falsch-positive Ergebnisse konnten weder im ersten noch im zweiten Ansatz für *E. floccosum*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *S. brevicaulis* sowie Human-DNA detektiert werden (Abbildung 18). *M. canis* zeigte keine positive Kreuzreaktion im *T. rubrum*/*T. interdigitale*-Lauf, ebensowenig *T. rubrum* und *T. interdigitale* im *M. canis*-Lauf.

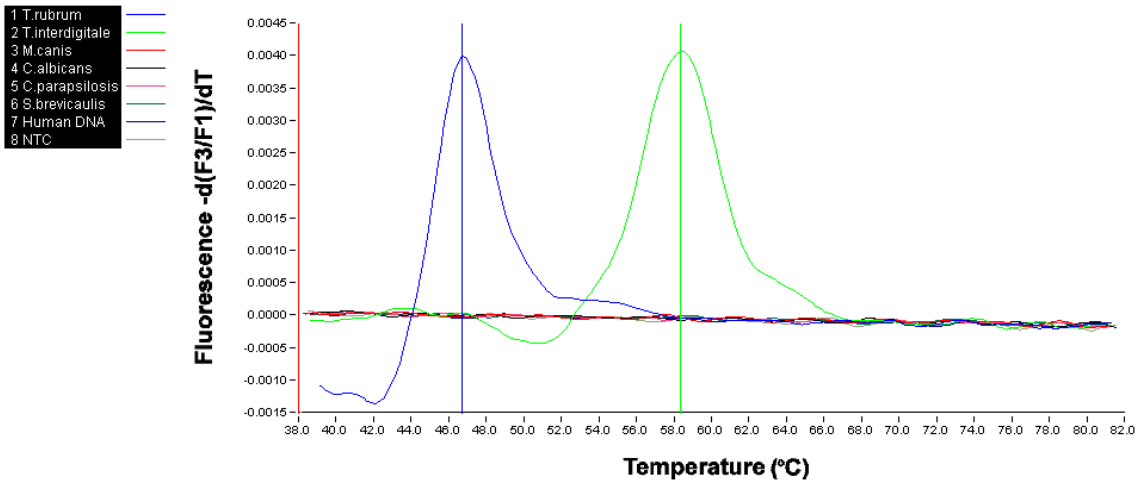

Abbildung 18: Spezifitätsbestimmung: Real-time PCR auf *T. rubrum*/*T. interdigitale*, Proben: Positivkontrollen aus Pilzkulturen

1: *T. rubrum*; 2: *T. interdigitale*; 3: *M. canis*; 4: *C. albicans*; 5: *C. parapsilosis* ; 6 *: S. brevicaulis* ; 7 : Human DNA ; 8 : NTC.

Da die *T. violaceum*-Sequenz der Sonden-Bindungsstelle mit der Sequenz von *T. rubrum* übereinstimmte, konnte keine Differenzierung zwischen diesen beiden Spezies erzielt werden.

Sequenzierung

Die Sequenzierung der LC-Amplifikate von *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *M. canis* erfolgte durch die Firma MWG, um eine Übereinstimmung mit den veröffentlichten Sequenzen der Gendatenbank (36) zu überprüfen. Im Bereich der Sequenz des Upstream-Primers A1 fiel sowohl für *T. rubrum* als auch für *T. interdigitale* an Position 11 der Basentausch T anstelle von G auf (Abbildung 19), der sich jedoch positiv auf die Schmelztemperaturverhältnisse zwischen Primer und Sonden auswirkte (siehe 0). Weitere Differenzen zwischen sequenzierter und in der Gendatenbank (36) veröffentlichter Sequenzen spielten keine Rolle, da sie nicht die Primer- und Sondenbindungsstellen betrafen.

```
            1CAGCGGAAGGTTTTGTACAC                                    50
T.rubrum     CAGCGGAAGGGTTTGTACACTATGTTTTAAACGCAATGTCAGAAGGGACAT
T.interd.    CAGCGGAAGGGTTTGTACACCATGTTCAAACGCAATGTTAGAAAGGATGT
M.canis      CAACGAAAAGTCCTATATACTATGTTTAAGCGCAATGTGAGAAAAGACAT

           51                                                   100
T.rubrum     CAAGGTTGTCGAGCTTGCTGGTTATGTCTCTGGTATGACGGCTTATCAGC
T.interd.    TAAGGTTGTCGAGCTTGCTGGTTATGTCTCCGGTATGACGGCTTATCAGC
M.canis      CAAAGTTGTTGAACTTGCTGGTTATGTCTCTGGTATGACGGCCTACCAGC

          101                                                   150
T.rubrum     ATGGTGATAACTCTTTGCATACCACTATTGTTGGTCTGGCTCAAACCTTC
T.interd.    ATGGTGATAACTCTTTGCATACGACTATTGTTGGCCTGGCTCAAACATTC
M.canis      ATGGTGATAACTCCCTTCACACAACTATCGTCGGCCTTGCTCAAACCTTT

          151                                                   200
T.rubrum     GTCGGCTCAAACAACATCAATTGTTTGGAACCCAGCGGTAACTTTGGAAG
T.interd.    GTCGGGTCAAATAACATCAATTGCTTGGAACCCAGCGGTAACTTTGGAAG
M.canis      GTCGGCTCAAACAACATCAACTGCTTAGAGCCCAGCGGCAATTTTGGAAG

          201                                GCCAGTGCTCGTTATAT      242
T.rubrum     TCGTCTCCAAGGAGGTTCTGACAGTGCCAGTGCTCGTTATAT
T.interd.    TCGCCTTCAAGGAGGTTCTGACAGCGCCAGTGCTCGTTATAT
M.canis      TCGTCTCCAGGGAGGATCTGACAGTGCCAGTGCTCGTTATAT
```

Abbildung 19: Sequenziertes LC-Amplifikat, Topoisomerase-II-Gen

Primer für *T. rubrum*/*T. interdigitale*-Lauf

Primer für *M. canis*-Lauf

Sonden

Basendifferenz zu *T. interdigitale*

Oligozentrische Studie: Ergebnisse

Im Zeitraum vom 12.02.-14.06.2006 wurden in den drei Testzentren München, Neu-Ulm und Tübingen insgesamt 524 konsekutiv gesammelte Proben von Patienten mit Verdacht auf Dermatophytose mittels PCR-ELISA untersucht. Bei vier Proben konnte weder ß-Globin noch Dermatophyten-DNA nachgewiesen werden, was zu einem Ausschluss dieser Proben führte, da eine korrekte DNA-Isolierung nicht gewährleistet war. 520 Proben wurden in die Studie eingeschlossen und die Ergebnisse aus konventioneller Routinediagnostik, PCR-ELISA und für 100 Proben auch Real-time PCR miteinander verglichen (Tabelle 25 und Tabelle 26).

München

Insgesamt wurden im Rahmen der oligozentrischen Studie in München 100 im Nativpräparat positive Patientenproben untersucht. In jeder dieser Proben konnte ß-Globin nachgewiesen werden, womit das Vorhandensein von amplifizierungsfähiger DNA bewiesen war.
56 % der Proben waren in der Kultur auf eine der fünf Dermatophytenspezies positiv, 44 % zeigten kein Kulturergebnis.
In 51 Proben konnte der mit Abstand häufigste Erreger *T. rubrum* kulturell nachgewiesen werden, in drei Proben *T. interdigitale* und in je einer Probe *T. violaceum* und *M. canis*.
Parallel zum Wachstum auf Kulturmedien wurden die Proben mit PCR-ELISA amplifiziert und detektiert. 79 % wurden positiv getestet, 69 Proben wiesen *T. rubrum*, sieben Proben *T. interdigitale* und je eine Probe *T. violaceum*, *M. canis* und *E. floccosum* auf. In 21 % der Fälle war kein Dermatophyten-Nachweis mittels PCR-ELISA möglich.
Bei 29 der 44 in der Kultur negativen Proben konnte mit Hilfe der PCR-ELISA-Technik ein Nachweis auf einen Dermatophyten geführt werden, hingegen waren nur sechs der in der Kultur positiven Proben mit der neuen molekularbiologischen Methode negativ.
Die Gesamtzahl aller Proben, die in der Kultur oder mit PCR-ELISA positiv waren, wird als 100 % gesetzt. Dies ergibt eine Sensitivität der Kultur von 65,9 % (56 von 85 Proben) gegenüber 92,4 % (79 von 85 Proben) des PCR-ELISA-Assays.

Tübingen

In Tübingen wurden insgesamt 104 nativ-positive Patientenproben in die Studie eingebracht: Davon waren 63,5 % in der Kultur positiv. *T. rubrum* stellte mit 89,4 % der positiven Proben den größten Anteil dar, *T. interdigitale* ließ sich in 9,1 % der Fälle nachweisen und *M. canis* war mit nur einer Probe (1,5 %) vertreten.

Im PCR-ELISA-Assay konnten hingegen 80,8 % positive Resultate abgelesen werden, wovon 90,5 % *T. rubrum* und 9,5 % *T. interdigitale* zeigten.

Von den 38 kulturell negativen Proben konnten im PCR-ELISA immerhin 17 Proben bestimmt werden; umgekehrt betrachtet waren hingegen nur drei von 20 PCR-negativen Proben mittels Kultur bestimmbar.

Mit einer Sensitivität von 96,6 % (84 von 87 Proben) des PCR-ELISA gegenüber 75,9 % (66 von 87 Proben) der Kultur wurden die Vorteile der genanalytischen Methode auch in der Tübinger Studie deutlich.

	Kultur		**PCR-ELISA**	
	München	**Tübingen**	**München**	**Tübingen**
negativ	44	38	21	20
T. rubrum	51	59	69	76
T. interdigitale	3	6	7	8
T. violaceum	1	0	1	0
M. canis	1	1	1	0
E. floccosum	0	0	1	0

Tabelle 25: Vergleich Kultur-/PCR-ELISA-Diagnostik, Anzahl der Patientenproben, München/Tübingen

Neu-Ulm

Die Einbeziehung von 316 Patientenproben (Tabelle 26) aus der Hautarzt-Gemeinschaftspraxis Bezold/Gottlöber in Neu-Ulm erfolgte unter dem Gesichtspunkt der praktischen Anwendbarkeit der entwickelten PCR-ELISA-Methode im Praxisalltag.

Da keine Möglichkeit einer mikroskopischen Nativuntersuchung bestand, wurden alle Proben lediglich mittels Kultur und PCR-ELISA untersucht.

Das Kulturpräparat war in 65,5 % aller Proben negativ, in 21,8 % konnte keine Auswertung vorgenommen werden, da die Platten mit Schimmel oder Bakterien verunreinigt waren. 5,7 % zeigten *T. rubrum*-, 1,3 % *T. interdigitale*- und 0,3 % *M. canis*-Wachstum.

Mit der PCR-ELISA-Technik waren 25,0 % aller Proben positiv. Bei zehn Patientenproben konnte eine Doppelbesiedlung mit zwei der fünf untersuchten Dermatophyten-Spezies fest-

gestellt werden. 14,6 % aller Proben wiesen *T. rubrum*, 5,4 % *T. interdigitale*, 2,5 % *T. violaceum*, 5,1 % *M. canis* und 0,6 % *E. floccosum* auf. Bezogen auf die PCR-positiven Fälle waren somit 58,2 % positiv auf *T. rubrum*, 21,5 % auf *T. interdigitale*, 10,1 % auf *T. violaceum*, 20,3 % auf *M. canis* und 2,5 % auf *E. floccosum*.
Insgesamt betrachtet beträgt in der Neu-Ulmer Untersuchung die Sensitivität der Kultur 23 % (23 von 100 Proben) im Vergleich zu 77 % (77 von 100 Proben) im PCR-ELISA-Verfahren.

	Kultur	**PCR-ELISA**
T. rubrum	18	46
T. interdigitale	4	17
T. violaceum	0	8
M. canis	1	16
E. floccosum	0	2
Sonstige (*Candida, T. tonsurans*)	17	0
Nicht auswertbar	69	0
Negativ	207	237

Tabelle 26: Vergleich Kultur-/PCR-ELISA-Diagnostik, Anzahl der Patientenproben, Neu-Ulm

Vergleich der Methoden

Für München und Tübingen stellt sich der Vergleich der Ergebnisse aus Kultur und PCR-ELISA wie folgt dar:

Häufigkeit		**PCR-ELISA**			
		München		**Tübingen**	
		neg	**pos**	**neg**	**pos**
Kultur	**neg**	15	29	17	21
	pos	6	50	3	63
Gesamt		100		104	

Tabelle 27: Häufigkeitsverteilung für München und Tübingen

Interessant ist die Betrachtung der Proben, die in der Kultur kein Wachstum zeigten, jedoch im PCR-ELISA ein positives Ergebnis erbrachten. In München waren dies 29,0 %, in Tübingen 20,2 % aller untersuchten Proben. Häufigsten Anteil daran hatte *T. rubrum* mit 79,3 % (München) bzw. 81,0 % (Tübingen). Betrachtet man die *T. interdigitale*-Fälle in

dieser Gruppe, so stellen sie zwar mit 13,8 % (München) und 19,0 % (Tübingen) einen geringen Anteil dar, bezogen auf alle *T. interdigitale*-Proben fällt allerdings auf, dass etwa jeder zweite *T. interdigitale*-Befall kein Ergebnis im Kulturpräparat brachte und nur durch PCR-ELISA nachgewiesen werden konnte (57,1 % München, 50,0 % Tübingen).

Festzuhalten sind einige Patientenproben, die zwar ein Dermatophyten-Wachstum in der Kultur zeigten, mittels der molekularbiologischen Methode aber keine Erreger festgestellt werden konnten. 6,0 % fielen in München und 2,9 % in Tübingen in diese Kategorie.

Die statistische Auswertung im McNemar-Test ergab jeweils für beide Test-Zentren wie auch für das Gesamtkollektiv aus den Münchner und Tübinger Proben einen hoch signifikanten Unterschied zwischen Kultur und PCR-ELISA-Methode ($p<0{,}001$), d. h. mit PCR-ELISA werden deutlich mehr Fälle positiv klassifiziert als mit der Kultur.

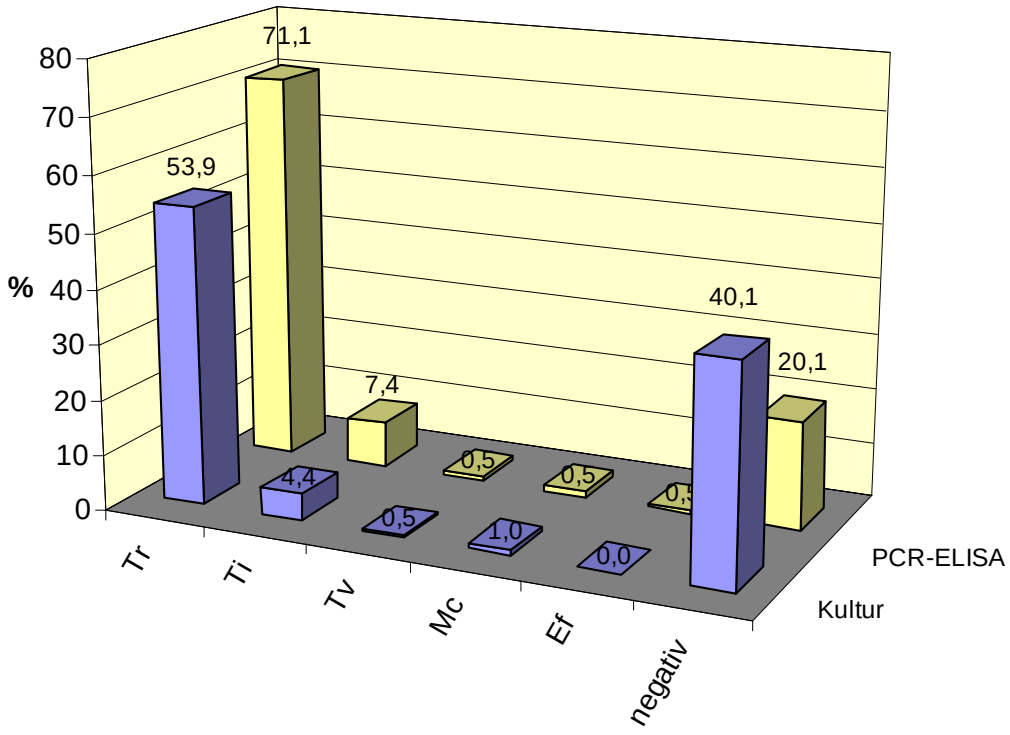

Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung der Proben aus München und Tübingen, Vergleich Kultur - PCR-ELISA

Tr: T. rubrum; Ti: T. interdigitale; Tv: T. violaceum; Mc: M. canis; Ef: E. floccosum

Die Sensitivität errechnete sich in der Kultur zu 70,9 % im Vergleich zu 94,8 % beim PCR-ELISA (122 gegenüber 163 von 172 Proben).

Die geringe Anzahl an Kultur-Ergebnissen aus den Neu-Ulmer Daten lässt eine statistische Bewertung hinsichtlich eines Vergleichs zwischen Kultur und PCR-ELISA nicht sinnvoll erscheinen.

Vergleich der Entnahmestellen

Aufgrund klinischer, diagnostischer und therapeutischer Besonderheiten erfolgt die Untergliederung der Tinea je nach Lokalisation in Tinea capitis, Tinea corporis, Tinea faciei, Tinea inguinalis, Tinea manuum, Tinea pedis und Tinea unguium (121).

Die Patientenproben wurden entsprechend ihrer Herkunft in dieses System eingeteilt.

Mit Abstand häufigster Verdacht auf eine durch Dermatophyten bedingte entzündliche Hauterkrankung waren in dieser Untersuchung in München wie in Tübingen Tinea unguium mit 59,0 % und 49,0 % sowie Tinea pedis mit 35,0 % und 35,6 % (Tabelle 28). Nur vereinzelte Proben stammten von einer Tinea corporis, Tinea capitis, Tinea manuum oder Tinea inguinalis.

Vergleicht man das Kultur- mit dem PCR-ELISA-Ergebnis getrennt nach Lokalisation, so zeigte sich eine statistisch signifikant höhere Detektionsrate der PCR-ELISA-Methode gegenüber der Kultur bei Tinea unguium (McNemar Test, $p<0,005$) sowohl für die Münchner (72,9 % gegenüber 45,8 %) als auch für die Tübinger Proben (86,3 % gegenüber 54,9 %). Für Tinea pedis konnte hinsichtlich dieses Vergleichs die statistische Signifikanz lediglich für die Gesamtauswertung der Münchner und Tübinger Proben festgestellt werden (81,9 % gegenüber 69,4 %; McNemar Test, $p<0,002$). Allerdings wurden in der Einzelauswertung sowohl in München (85,7 % gegenüber 65,7 %) als auch in Tübingen (78,4 % gegenüber 73,0 %) deutlich mehr positive Ergebnisse mit PCR-ELISA als mit der Kultur nachgewiesen. Die Unterschiede in den Ergebnissen zwischen Tinea unguium und Tinea pedis werden besonders bezüglich der Kultur ersichtlich: Nur 50 % aller Münchner und Tübinger Proben lieferten bei einer Nagelprobe einen positiven Nachweis auf einen der untersuchten Dermatophyten, hingegen konnte in 69,4 % bei Verdacht auf Tinea pedis ein Wachstum in der Kultur gesehen werden. Im χ^2-Test zeigte sich somit ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Tinea unguium und Tinea pedis ($p<0,01$). Interessant ist die Nivellierung dieses Unterschieds im PCR-ELISA: Hier ist die Detektionsrate für Proben von Tinea unguium mit 79,1 % annähernd so hoch wie für Proben von Tinea pedis (81,9 %).

Die Betrachtung der Daten aus Neu-Ulm ergibt ein differenziertes Bild:
Bei 23,4 % aller untersuchten Patientenproben ergab sich die Verdachtsdiagnose einer Tinea unguium, bei 24,4 % einer Tinea pedis, bei 30,1 % einer Tinea corporis und bei 11,1 % einer Tinea manuum, alle weiteren lagen im einstelligen Prozentbereich (Tabelle 28).
Die PCR-ELISA-positiven Proben konnten hingegen in 35,4 % einer Tinea unguium, in 39,2 % einer Tinea pedis und in 11,4 % einer Tinea corporis zugeordnet werden, häufigste Lokalisation einer Dermatophytose sind also - wie die Daten aus München und Tübingen ebenfalls zeigten - Finger- und Zehennägel sowie Fuß- und hier insbesondere Zehenzwischenraumbereiche.

	Häufigkeit		
	München	**Neu-Ulm**	**Tübingen**
T. capitis	1	21	2
T. corporis	4	95	8
T. faciei	0	8	0
T. inguinalis	0	6	4
T. manuum	1	35	2
T. pedis	35	77	37
T. unguium	59	74	51

Tabelle 28: Untergliederung nach Lokalisation der gewonnenen Patientenproben

Vergleich der Probenmenge

Die gewonnenen Patientenproben wurden in folgende vier „Mengengruppen“ eingeteilt: <6 mg, 6-10 mg, 11-15 mg und >15 mg (Tabelle 29).
Auffällig war mit 63 % die große Anzahl an Münchner Proben, die weniger als 6 mg wogen. 20 % fielen immerhin noch in die Gruppe von 6-10 mg und bei nur insgesamt 17 % wurde so viel Material gewonnen, dass nach Nativ- und Kulturpräparat mehr als 10 mg übrig blieben. Die Unterschiede in den Kulturergebnissen zwischen den einzelnen Mengengruppen waren äußerst gering, da für die Kultur eine einheitliche Menge an Probenmaterial eingesetzt wurde. Im PCR-ELISA wurde hingegen deutlich, dass Probenmengen unter 6 mg zu einer höheren Rate an negativen Ergebnissen führte als beim Einsatz von größeren Probenmengen: <6 mg: 25,4 %, 6-10 mg: 10,0 %. Eine statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kultur und PCR-ELISA konnte in den beiden Gruppen <6 mg und 6-10 mg festgestellt werden

(McNemar-Test, jeweils $p<0,05$), eine getrennte statistische Auswertung der Mengengruppen mit Materialmengen über 10 mg war aufgrund der geringen Fallzahlen nicht sinnvoll.

In Tübingen lag das Gewicht von 87,5 % aller Proben über 10 mg. Zwischen den Gruppen 11-15 mg und >16 mg konnten keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen ausgemacht werden. Einzig zwischen Proben mit kleinerer und Proben mit größerer Masse als 10 mg wurde die Tendenz beobachtet, dass deutlich mehr positive Nachweise auf Dermatophyten sowohl in der Kultur (67,0 % gegenüber 38,5 %) also auch mit PCR-ELISA (83,2 % gegenüber 61,5 %) bei größeren Probenmengen über 10 mg resultierten (χ^2-Test, $p<0,05$).

Die Verteilung der Proben in Neu-Ulm in Mengengruppen stellte sich folgendermaßen dar: 3,2 % fielen in die Gruppe mit einem Gewicht <6 mg. Mit 45,9 % waren die Proben mit 6-10 mg am häufigsten, 32,6 % hatten ein Gewicht von 11-15 mg und 18,4 % lagen über 15 mg.

Menge des Haut- oder Nagelmaterials	**München**	**Neu-Ulm**	**Tübingen**
<6 mg	63	10	1
6-10 mg	20	145	12
11-15 mg	9	103	30
>15 mg	8	58	61

Tabelle 29: Vergleich der Probenmengen

Real-time PCR

Alle 100 Patientenproben aus München wurden im Anschluss an die oligozentrische Studie mit Hilfe des LightCyclers in einer Real-time PCR auf die Anwesenheit von genomischer DNA von *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *M. canis* untersucht (Tabelle 30). 88 % der Proben zeigten ein positives Ergebnis, 11% waren negativ. *T. rubrum* war mit 81 Fällen insgesamt der häufigste Dermatophyt, *T. interdigitale* wurde in sieben Proben und *M. canis* in einer Probe nachgewiesen.

Der Vergleich der Kultur- und LightCycler-Ergebnisse erbrachte eine signifikant höhere Detektionsrate für den Nachweis mittels Real-time PCR (McNemar-Test, $p<0,005$).

Auch gegenüber der PCR-ELISA-Methode zeigte sich eine Steigerung der positiven Ergebnisse mit 88 % positiven Proben im LightCycler gegenüber 79 % positiven Proben im PCR-ELISA (McNemar-Test, $p<0,1$).

Zwischen den einzelnen Lokalisationen der gewonnenen Patientenproben wie auch zwischen den Mengengruppen konnten bei dieser Real-time PCR keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Demnach spielen Unterschiede in der DNA-Target-Menge - solange sie sich in den Nachweisgrenzen befinden - keine so große Rolle wie beim Nachweis der Dermatophyten-DNA mittels PCR-ELISA.

	Kultur	**PCR-ELISA**	**Real-time PCR**
Negativ	44	21	11
T. rubrum	51	69	81
T. interdigitale	3	7	7
T. violaceum	1	1	-
M. canis	1	1	1
E. floccosum	0	1	-

Tabelle 30: Häufigkeitsverteilung der Patientenproben für München, Vergleich Kultur/PCR-ELISA/Real-time PCR am LightCycler

Kosten

Die Kosten für die konventionelle Dermatophyten-Diagnostik liegen mit 2,36 € je Patientenprobe deutlich niedriger als für eine molekularbiologische Diagnostik-Methode, zumal auch kein großer Bedarf an technischem Gerät vonnöten ist. Aufgrund des hohen Preises der ELISA-Platten ist der PCR-ELISA-Assay mit 13,08 € teurer als die Untersuchung einer Patientenprobe mittels Real-time PCR am LightCycler mit 9,96 € (siehe **Tabelle 31**, Stand 03/2007).

Nach der aktuellen Gebührenordnung für Ärzte (GOÄ, Stand 03/2007) können derzeit für eine konventionelle Dermatophyten-Diagnostik mit Nativpräparat, einem einfachen und einem aufwändigeren Kulturpräparat sowie einer lichtmikroskopischen Identifizierung der angezüchteten Pilze 26,80 € mit dem einfachen und 30,86 € mit dem zulässigen 1,15-fachen Gebührensatz abgerechnet werden. Die Vergütung für eine molekulargenetische Diagnostik einer Pilzspezies, wie sie mit der PCR-ELISA oder der Real-time PCR am LightCycler durchgeführt wurde, beträgt 75,77 € mit dem einfachen und 87,13 € mit dem zulässigen Satz. Allerdings werden die Amplifizierung sowie die Hybridisierung der DNA für jede Dermatophytenspezies gesondert berechnet, so dass bei Untersuchungen von drei Spezies Vergütungen von 169,03 € und 194,37 € bzw. bei 5 Spezies von 262,29 € und 301,61 € resultieren (siehe Tabelle 32).

Der personelle Aufwand für eine konventionelle Diagnostik und die Real-time PCR ist in etwa gleich hoch mit ca. 2-3 Stunden für 10 Patientenproben. Die PCR-ELISA-Methode erfordert hingegen 5 Stunden, da die verschiedenen Hybridisierungsschritte während des ELISA mehr Zeit in Anspruch nehmen.

Methode	Bezeichnung	Umfang	Preis[€] (Stand: 2007)	Benöt. Menge je Probe	Kosten je 10 Proben [€]	Kosten je Probe [€]
Konventionelle Diagnostik	Nativpräparat		0,20	1 St.	2,00	0,20
	Kimmig-Nährboden	20 St.	18,00	1 St.	9,00	0,90
	Nährboden zur Subkultur (z. B. Dermatophyten-Selektivnährboden nach Taplin, Sabouraud-Glucose-Nährboden mit Cycloheximid)	20 St.	25,20	1 St.	12,60	1,26
				Summe	**23,60**	**2,36**
DNA-Isolierung						
	QIAamp DNA Mini-Kit	250 Rkt.	595,00	1 Rkt.	47,60	4,76
	Ethanol	1000 ml	34,40	100µl	0,03	0,00
	Pipettenspitzen				6,91	0,69
PCR	dNTP	1 ml	97,00	1 µl	0,58	0,06
	Primer U	250 µl	23,13	6 µl	5,55	0,56
	Primer D	1300 µl	174,00	6 µl	8,03	0,80
	Taq DNA-Polymerase, Puffer	250 U	75,00	1,2 U	3,60	0,36
	Mineralöl	500 ml	39,90	20 µl	0,02	0,00
	PCR-Gefäße, Ketten	480 St.	135,00	1 St.	0,56	0,06
	Deckelketten	480 St.	56,50	1 St.	0,24	0,02
	Pipettenspitzen				6,63	0,66
ELISA	Anti-Dig-AK	50 U	212,50	6 mU	0,25	0,03
	Conjugate Buffer	100 ml	59,00	600 µl	3,54	0,35
	Denaturation Solution	6 ml	30,50	120 µl	6,10	0,61
	Hybridization Buffer	100 ml	55,00	600 µl	3,30	0,33
	Sonden	31 ml	121,80	6 µl	0,24	0,02
	TMB-Farbstoff	100 ml	62,50	600 µl	3,75	0,38
	ELISA-Platte	480 Rkt.	238,00	6 Rkt.	29,75	2,98
	Pipettenspitzen				4,09	0,41
				Summe	**130,77**	**13,08**
DNA-Isolierung						
	QIAamp DNA Mini-Kit	250 Rkt.	595,00	1 Rkt.	47,60	4,76
	Ethanol	1000 ml	34,40	100µl	0,03	0,00
	Pipettenspitzen				6,91	0,69
LightCycler	LC Hyb Probe Kit	960 Rkt.	778,00	2 Rkt.	16,21	1,62
	LC Capillaries	768 St.	395,00	2 St.	10,29	1,03
	Primer U	500 µl	14,30	2 µl	0,57	0,06
	Primer D	500 µl	14,30	2 µl	0,57	0,06
	Sonde FL	500 µl	90,00	2 µl	3,60	0,36
	Sonde 705	500 µl	230,00	2 µl	9,20	0,92
	Pipettenspitzen				4,65	0,47
				Summe	**99,63**	**9,96**

Tabelle 31: Kostenauflistung

Rkt.: Reaktion(en), St.: Stück

GOÄ	Bezeichnung der Leistung	Abrechnungsziffer	Punktzahl	einfacher Gebührensatz [€]	zulässiger Gebührensatz [€]
Nativpräparat					
	Lichtmikroskopische Untersuchung zum Nachweis von Pilzen im Nativmaterial nach Präparation (z. B. Kalilauge) oder aufwändigerer Anfärbung (z. B. Färbung mit Fluorochromen, Baumwollblau-, Tuschefärbung), je Material	4711	120	6,99	8,05
Kultur					
	Untersuchung zum Nachweis von Pilzen durch An- oder Weiterzüchtung auf einfachen Nährmedien (z. B. Sabouraud-Agar), je Nährmedium	4715	100	5,83	6,71
	Untersuchung zum Nachweis von Pilzen durch An- oder Weiterzüchtung auf aufwändigeren Nährmedien (z. B. Antibiotika-, Wuchsstoffzusatz), je Nährmedium	4716	120	6,99	8,05
	Züchtung von Pilzen auf Differenzierungsmedien (z. B. Harnstoff-, Stärkeagar), je Nährmedium	4717	120	6,99	8,05
	Lichtmikroskopische Identifizierung angezüchteter Pilze einschließlich Anfärbung (z. B. Färbung mit Fluorochromen, Baumwollblau-, Tuschefärbung), je Untersuchung	4722	120	6,99	8,05
Molekularbiologische Identifizierung					
	Isolierung von Nukleinsäuren	4780	900	29,14	33,51
	Amplifikation von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten mit Polymerasekettenreaktion (PCR)	4783	500	29,14	33,51
	Identifizierung von Nukleinsäurefragmenten durch Hybridisierung mit radioaktiv oder nichtradioaktiv markierten Sonden und nachfolgender Detektion, je Sonde	4785	300	17,49	20,11

Tabelle 32: Vergütungssätze nach GOÄ

4. DISKUSSION

Die Charakterisierung und Identifizierung von Dermatophyten zählt auch heute noch zu den schwierigsten Aufgaben des mykologischen Labors. Klassische Routinemethoden der Pilzdiagnostik umfassen mikroskopische, kulturelle und verschiedene histologische Untersuchungsmethoden (90). Eine Erregerdifferenzierung stößt gelegentlich an ihre Grenzen, da sie abhängig von teils schwierig abzugrenzenden morphologischen Artunterschieden, von nicht immer reproduzierbaren physiologischen Parametern, mitunter auch von gänzlich fehlenden phänotypischen Charakteristika und auftretenden Pleomorphismen ist. Außerdem stellen das langsame Dermatophyten-Wachstum und die zeitaufwändigen konventionellen Diagnosemethoden große Einschränkungen dar, eine gezielte und rasche Therapie einzuleiten. Weiters ist eine kontinuierliche Optimierung der Dermatophyten-Diagnostik aufgrund der beständigen Pathomorphose der Dermatophyten und des fortschreitenden Erregerwandels vonnöten. Molekularbiologisch basierte Verfahren, wie PCR und Gensondentechniken ermöglichen die Unabhängigkeit von distinkten morphologischen Veränderungen und Entwicklungsstadien der Erreger und bieten deutliche Vorteile in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und Schnelligkeit des Dermatophyten-Nachweises.

Die Möglichkeit, Pilz-DNA direkt aus dem Untersuchungsmaterial zu isolieren, bietet einen weiteren großen Vorteil gegenüber der überwiegenden Zahl bisher beschriebener molekularbiologischer Techniken (34, 42, 66, 81, 132), die fungale DNA aus Kulturpräparaten einsetzen. Neben der Etablierung einer DNA-Extraktionsmethode direkt aus Patientenproben wurden in der vorliegenden Arbeit zwei PCR-gestützte Diagnoseverfahren entwickelt, die ihre Eignung und Anwendbarkeit im routinemäßigen Einsatz in den mykologischen Laboren der Dermatologischen Klinik in München und der Hautklinik in Tübingen wie auch im Praxislabor einer Gemeinschafts-Hautarztpraxis in Neu-Ulm im Rahmen einer oligozentrischen Studie unter Beweis stellten und darüber hinaus auch weiterhin in der Routinediagnostik eingesetzt werden.

Methoden-Etablierung

DNA-Extraktionsverfahren

Die Zellwand der Ascomyceten besteht zu 90 % aus Polysacchariden wie Glukanen, Mannanen und Chitin, ferner aus Proteinen wie Galaktomannoproteinen (57). Glukane bilden mit ihren (1-3)-ß- und (1-6)-ß-Bindungen das Hauptgerüst, mit dem Chitin, ein (1-4)-ß-N-acetyl-D-Glucosamin, und Mannane kovalent quervernetzt sind. Die starre Zellwand der Dermatophyten, die wie ein Exoskelett wirkt, verleiht der Pilzzelle Stabilität, um dem osmotischen Druck im Innern des Protoplasten standzuhalten und schützt vor chemischen wie physikalischen Umwelteinflüssen.

Die DNA-Extraktion aus Dermatophyten-Zellen stößt auf einige Schwierigkeiten, die mit ausgewählten, kommerziell erhältlichen DNA-Extraktions-Kits und wenigen Modifikationen gelöst wurden: Die besten DNA-Ausbeuten lieferten Systeme, bei denen Mini-Prep-Säulen auf Silikat-Matrix-Basis zur Anwendung kamen, allerdings konnte bei Verwendung von Pilzzellen aus Kulturen nicht auf das Mörsern mit einem Plastikpistill vor der Lyse verzichtet werden, da das „geerntete“ Luftmyzel im Lysepuffer nur schlecht benetzt wurde und die Konglomerate durch das Mörsern erst zerteilt werden mussten. Ein zu starkes Mörsern muss jedoch vermieden werden, um eine unspezifische Fragmentierung der DNA durch mechanische Scherkräfte zu verhindern.

Die Reinigungsschritte bei der DNA-Isolierung sind streng zu beachten, da es insbesondere bei *T. interdigitale* aus Kulturen immer wieder zu PCR-Inhibition kam, was vermutlich durch inhibitorische Proteine dieser Dermatophyten-Spezies bedingt war.

Ein Vorteil der DNA-Isolierung mittels Mini-Prep-Säulen ist ferner die Vermeidung bisher gebräuchlicher umwelt- und gesundheitsbedenklicher Phenol-Chloroform-Reinigungsschritte, die zwar einen relativ hohen Reinigungsgrad, aber auch einen entsprechenden DNA-Verlust bedingen.

Die Isolierung von Dermatophyten-DNA direkt aus unbehandeltem Patientenmaterial ist bisher nur in wenigen Arbeiten beschrieben worden: So kommen bei Baek et al. (3), El Fari et al. (28), Kano et al. (69) und Turin et al. (132) Phenol-Chloroform-Extraktionsmethoden zur Anwendung, lediglich bei Bock et al. (18), Kardjeva et al. (71) und Machouart-Dubach et al. (87) werden kommerziell erhältliche DNA-Extraktionskits verwendet.

Erstaunlicherweise war mit dem in dieser Arbeit eingesetzten QIAamp-Isolierungskit die DNA-Extraktion aus Patientenmaterial komplikationsloser als bei Material aus Pilzkulturen. Es kam bei keiner der untersuchten Proben aus München zu einer PCR-Inhibition, in vier Fällen konnte allerdings weder ß-Globin noch Dermatophyten-DNA nachgewiesen werden,

was in einem Ausschluss dieser Proben aus dem Studienergebnis resultierte, da die ordnungsgemäße DNA-Isolierung hierdurch nicht nachvollzogen werden konnte (siehe 0). Erklärbar wird dieser Ausfall durch die äußerst kleinen Probenmengen, was dazu führen kann, dass eine zu geringe Anzahl an Pilzzellen und humaner DNA in den gewonnen Proben vorhanden war.

PCR-Techniken

Die Etablierung einer PCR-gestützten Methode zur Differenzierung und Identifizierung von Dermatophyten ist oftmals mit Schwierigkeiten behaftet: Da zwischen Dermatophyten-Arten eine enge phylogenetische Verwandtschaft besteht, sind große Teile des Genoms hoch konserviert und weisen nur geringfügig genetische Polymorphismen auf. Ziele bisheriger Arbeiten stellten Gene dar, die für die kleine ribosomale Untereinheit (18rRNA) (17), für ITS- (60) und NTS-Regionen (62), Topoisomerase II (65), Chitinsynthase 1 (68), ATPase 9 (130) oder Actin (98) kodieren. In den Gendatenbanken sind bislang nur die Gensequenzen zu diesen Genen bzw. Teilausschnitte daraus veröffentlicht. Das komplette Genom, wie es z. B. bei Candida bereits zu finden ist, wurde bisher von keiner Dermatophyten-Art sequenziert (36).

Nicht jeder genetische Unterschied ist für eine Artabgrenzung auch von Relevanz. So müssen zur Identifizierung der amplifizierten Nukleinsäuren geeignete Genabschnitte gefunden werden, die für eine Differenzierung auf Artebene geeignet sind und gleichzeitig keine Kreuzreaktionen mit anderen Erregern zulassen.

In den „Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik“ (110) werden in Bezug auf die Spezifität der amplifizierten Nukleinsäuren geeignete Methoden gefordert, die entweder eine Hybridisierung, eine Restriktionsenzymanalyse oder die Sequenzierung der Amplicons umfassen; eine Befundung der PCR-Resultate alleine nach der Größe der Amplifikate nach elektrophoretischer Trennung ist demnach nicht ausreichend. Mit den entwickelten Ansätzen RFLP, PCR-ELISA und der Real-time PCR am LightCycler werden diese Anforderungen erfüllt (siehe 0-0).

Thermocycler

Für die Nukleinsäureamplifikationstechnik des PCR-Fingerprintings, wie sie bei der AP-PCR und der verwandten RAPD zur Anwendung kommt, sind nur geringe Informationen über die Gensequenzen der untersuchten Erreger nötig. Hierbei werden polymorphe DNA-Abschnitte durch die Bindung von einzelnen Zufallsprimern nachgewiesen und anhand des charakteristischen Fingerprinting-Amplifikationsmusters nach Vergleich mit PCR-Profilen charakterisierter Referenz-Stämme zur Differenzierung von Dermatophyten-Spezies und -Varianten herangezogen. Erstmals 1990 beschrieben durch Welsh und McClelland (136) sowie durch Williams et al. (140) ist diese Methode aufgrund der mangelnden Reproduzierbarkeit bereits bei geringen Änderungen der PCR-Bedingungen für eine breite Anwendung im mykologischen Routinelabor ungeeignet (64). Desweiteren kann das PCR-Fingerprinting keine Anwendung bei nativen Patientenproben finden, da Human-DNA ebenfalls mit den unspezifischen Primern interagiert.

Bei der RFLP wird die Forderung der „Qualitätsstandards für NAT“ (111) in Bezug auf Nachweisbarkeit der PCR-Amplifikate durch die Restriktionsenzymanalyse des Amplicons erfüllt. Mit den entwickelten Primern ITS1 und ITS2 wurde hierbei ein Dermatophyten-spezifisches Primerpaar entwickelt. Aufgrund der relativ geringen Differenzen in den Fragmentgrößen zwischen *T. interdigitale* mit 50 bp- und 100 bp-Fragmenten und *M. canis* mit 40 bp- und 100 bp-Fragmenten wurde auf eine weitere aufwändige Weiterentwicklung und Etablierung dieser Methode zugunsten der weitaus aussichtsreicheren PCR-ELISA-Technik verzichtet.

PCR-ELISA

Das auf Hybridisierung basierende ELISA-System zum Nachweis der PCR-Produkte vereint mehrere Vorteile in sich: Nach Amplifizierung des Targets kann das Vorhandensein einer internen Sequenz durch die Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde verifiziert und damit das PCR-Produkt identifiziert werden. Bei einer Gelelektrophorese und darauffolgender unspezifischer Bandenfärbung ist dies hingegen nicht möglich. Lediglich der Southern Blot bietet noch die Möglichkeit, das PCR-Amplifikat nach Gelelektrophorese zu identifizieren, was allerdings die Bearbeitung einer hohen Probenanzahl durch die sehr arbeitsintensive Methodik erschwert.

Ein hoher Probendurchsatz ist bei der PCR-ELISA durch die Verwendung des 8 x 12 Mikrotiterplattenformats sowohl in der PCR als auch im ELISA und den Einsatz von Mehrkanalpipetten möglich. Vorteilhaft ist außerdem die Übertragung der ELISA-Detektion auf jede andere PCR, indem digoxigenierte Primer und biotinylierte Sonden variiert werden. So wurde in dieser Arbeit der Nachweis auf fünf verschiedenen Dermatophyten-Arten wie auch auf humanes ß-Globin in einem Versuchsansatz nebeneinander durchgeführt. Das eigentliche Nachweissystem mit Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten und enzymkonjugierten Anti-Dig-Antikörpern blieb gleich, so dass die Amplifikate verschiedener PCR-Ansätze auf derselben ELISA-Platte gemessen werden konnten.

Die Möglichkeit der einfachen visuellen Detektion eines positiven Ergebnisses mittels bloßem Auge und Dokumentation entweder durch einen ELISA-Reader oder mit einer Digitalkamera macht dieses System für die Anwendung im Routine-Labor auch für die Praxis unkompliziert und praktikabel.

Ein weiterer Vorteil des PCR-ELISA-Systems ist die hohe Sensitivität, die um das 10fache höher lag als beim Nachweis mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Ethidiumbromidfärbung (siehe 0). Generell wird sogar von einer 10-100fach höheren Sensitivität der PCR-ELISA gegenüber der Gelelektrophorese ausgegangen (86, 118, 126).

Hinsichtlich der Spezifität des PCR-ELISA-Verfahrens gegenüber den fünf untersuchten Dermatophyten-Spezies sind zunächst die taxonomischen Verhältnisse näher zu betrachten:

Trichophyton mentagrophytes stellt sich als sehr heterogener Komplex dar, der nach alter Nomenklatur sechs Varietäten umfasst. Die sexuell reproduktiven Formen werden von den unterschiedlichen teleomorphen Spezies *Arthroderma benhamiae, Arthroderma simii* und *Arthroderma vanbreuseghemii* repräsentiert. Anamorph und teleomorph sich entsprechende Spezies sind sie zwar genetisch sehr ähnlich, jedoch nur in den seltensten Fällen in der kompletten Sequenz identisch (41). Anhand von molekularen Analysen, insbesondere der ITS-

Region und des CHS1-Gens mittels PCR-fingerprinting, wird die alte Nomenklatur der anamorphen Vertreter des *Trichophyton*-Komplexes so nicht mehr aufrechterhalten (41, 67, 70). Derzeit wird folgende Spezies-Einteilung bei den Dermatophyten mit 3 Clustern vertreten: Als Anamorphe der Gruppe um *A. vanbreuseghemii* werden die Spezies *T. tonsurans*, *T. equinum* und *T. interdigitale* angegeben.

Morphologisch nahezu identisch zu *A. vanbreuseghemii* ist die teleomorphe Spezies *A. simii*, deutliche Unterschiede bestehen jedoch zu *A. benhamiae* (40). *A. simii* umfasst die Anamorphe *T. schoenleinii* und *T. mentagrophytes*; *A. benhamiae* hingegen die drei Spezies *T. concentricum*, *T. verrucosum* und *T. erinacei* (41).

Die beiden kulturell und morphologisch zu differenzierenden Varietäten von *T. mentagrophytes*, einerseits mit dem granulären Typ andererseits mit dem flaumigen Typ werden als getrennte taxonomischen Einheiten dargestellt und nach neuer Nomenklatur den Spezies *T. mentagrophytes* (granulär) und *T. interdigitale* (flaumig) zugeordnet (39). *T. mentagrophytes* verursacht als zoophile Spezies primär akute Dermatophytosen mit Bevorzugung des Stammes und ist mit einer Infektion ausgehend von Nagetieren assoziiert. *T. interdigitale* hingegen ist als anthropophiler Erreger überwiegend bei Tinea pedis zu finden.

Mit Hilfe der entwickelten Primer und der Sonde für *T. interdigitale* werden die mit der *A. vanbreuseghemii*-Klade assoziierten Spezies *T. interdigitale*, *T. quinckeanum* und *T tonsurans* nachgewiesen: *T. interdigitale* und *T. quinckeanum* unterscheiden sich in der gesamten veröffentlichten Topoisomerase-II-Sequenz lediglich in zwei Basenpaaren (36), die für eine Speziesunterscheidung nicht nutzbar waren. Zwischen *T. interdigitale* und *T. tonsurans* sind im Alignment der beiden Sequenzen einige vereinzelte Basenunterschiede auszumachen, jedoch sind auch hier die Differenzen räumlich zu weit entfernt voneinander, um eine sinnvolle Trennung der beiden Spezies mit spezifischen Primern und Sonden zu ermöglichen. Die in dieser Arbeit verwendete Upstream-Primer-Sequenz für *T. interdigitale* weist eine einzige Basendifferenz zur *T. tonsurans*-Sequenz auf, allerdings wurde *T. tonsurans* in den Kreuzreaktionsversuchen trotz dieses Unterschieds mit dem Primer-/Sonden- Set für *T. interdigitale* nachgewiesen.

Die Vertreter der beiden Kladen *A. simii* und *A. benhamiae*, wie sie nach derzeitiger Nomenklatur eingeteilt werden, ergaben - soweit sie als Kulturen mit *T. mentagrophytes* und *T. verrucosum* zur Verfügung standen - keine Kreuzreaktionen. Zwei in der Neu-Ulmer Teilstudie in der Kultur als *T. mentagrophytes* var. *granulosum* identifizierten Patientenproben werden nach neuer Nomenklatur ebenfalls mit dem Teleomorph *A. benhamiae* assoziiert und ergaben erwartungsgemäß keine positive Reaktion im PCR-ELISA. Sowohl die Spezies des *A. simii*-

als auch des *A. benhamiae*-Komplexes weisen jeweils zwischen 8 bp und 10 bp Unterschiede in den Bereichen der Primer- und Sondensequenzen zu *T. interdigitale* auf, was die fehlende Reaktion im PCR-ELISA erklärt.

Weniger komplex stellt sich hingegen die Situation im *T. rubrum*-Komplex dar, da bisher keine teleomorphen Formen bekannt sind:

Neben *T. rubrum* als Erreger von Tinea pedis und Onychomykose wird die anamorphe Spezies *T. violaceum* diesem Komplex zugeordnet (41), die vorwiegend zu Tinea capitis führt. *T. violaceum* ist überwiegend in Afrika verbreitet, zunehmend treten allerdings auch im europäischen Raum Einzelfälle - in der Regel mit Migrationshintergrund - auf, während *T. rubrum* hingegen weltweit zu finden ist (97).

Die Sequenzen des Topoisomerase-II-Gens von *T. rubrum* und *T. violaceum* sind in großen Teilen identisch (36). Der *T. violaceum*-Upstream-Primer liegt jedoch auf einer für *T. violaceum* spezifischen Sequenz, so dass in der PCR-ELISA keine Kreuzreaktionen mit *T. rubrum* auftraten (siehe 0).

Die *T. rubrum*-Primer und die entsprechende Sonde würde nach Vergleich mit den in der Gendatenbank veröffentlichten Sequenzen theoretisch auch mit *T. violaceum* eine positive Reaktion ergeben, allerdings konnten keine falsch-positiven Ergebnisse in den Kreuzversuchen mit Pilzkulturen als Positivkontrollen festgestellt werden. Für *M. canis* und *E. floccosum* ergaben sich keinerlei Probleme in der PCR-ELISA.

Für Nukleinsäure-Amplifikationstechniken wurden im Auftrag der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) „Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik“ veröffentlicht (110). Darin werden zur Absicherung der Validität der Amplifikation sowohl Negativ- und Positivkontrollen als auch Kontrollen zum Ausschluss einer PCR-Inhibition gefordert. Hinsichtlich der Negativkontrollen wurde den Anforderungen entsprochen, indem Schuppenmaterial von Psoriasis-Patienten, die negativ auf Dermatophytosen waren, während der gesamten Probenverarbeitung und zusätzlich Reaktionsansätze ohne Nukleinsäuren, d. h. nur mit Reagenzien während der PCR mitgeführt wurden. Gleichzeitig dienten die Psoriasis-Negativkontrollen als Positivkontrollen für humanes ß-Globin. Als Positivkontrollen wurde für jede der fünf Dermatophyten-Spezies eine Kontrolle aus den entsprechenden aufbereiteten Pilzkulturen mitgeführt.

Weiters muss das Auftreten einer Hemmung der PCR-ELISA-Reaktion für jede Probe bestimmbar sein, was durch Hinzufügen von Kontroll-Zielsequenzen erreicht werden kann. In den Qualitätsstandards wird die Möglichkeit genannt, mit jeder Probe zwei PCRs durchzuführen, wobei der erste Reaktionsansatz nur die Proben-DNA und der zweite Ansatz neben der Proben-DNA die Target-DNA als Positivkontrolle enthält. Fällt die zweite Reaktion negativ aus, so liegt eine PCR-Inhibition vor. Streng genommen schließt dieses Vorgehen eine mögliche Inhibition im ersten Probenansatz nicht aus, eine kompetitive PCR in einem einzigen Ansatz wäre die korrekte Durchführung, was zunächst auch versucht wurde. Allerdings senkte eine kompetitve PCR so deutlich die PCR-Effizienz, dass viele Ergebnisse als falsch-negativ gewertet wurden. Eine sehr geringe Menge an Dermatophyten-DNA wurde dabei durch eine im Verhältnis dazu größere Mimic-Menge „überlagert“, so dass die eigentliche Ziel-Sequenz der Erreger nicht mehr amplifiziert wurde. Im Rahmen der oligozentrischen Studie wurden daher alle Münchner und Tübinger Proben mit Kontroll-Zielsequenzen, den sogenannten Mimics, in einer separaten Reaktion auf PCR-Inhibition untersucht. In keiner der Patienten-Proben trat eine Inhibition auf, allerdings wurden bei der Etablierung dieser Technik bei Proben aus *T. interdigitale*-Kulturen immer wieder PCR-Inhibitionen festgestellt, wenn die isolierte DNA in zu hoher Konzentration verwendet wurde. Bei der DNA-Isolierung scheint bei diesem Dermatophyten ein Stoffwechselprodukt in das Eluat überzugehen, das PCR-Reaktionen zu inhibieren vermag.

Das Vorhandensein amplifikationsfähiger DNA in der DNA-Präparation wird zusätzlich durch die Vervielfältigung eines humanen Gens, in diesem Fall ß-Globin, nachgewiesen.

Bei negativer ß-Globin-PCR ist es trotzdem möglich, dass die Dermatophyten-PCR positiv verlief. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich in intaktem Stratum corneum normalerweise kaum humane DNA findet, ebenso wenig wie in Hornmaterial von Nägeln. Bei negativem Ergebnis auf einen der fünf Dermatophyten und fehlenden Nachweis des ß-Globin-Kontrollgens ist eine Beurteilung dieser PCR-Reaktion nicht möglich, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die DNA-Extraktion fehlschlug.

Real-time PCR am LightCycler

Die Grundlagen für eine quantitative Real-time PCR wurden bereits 1992 durch Higuchi et al. gelegt (55), indem erstmals PCR-Geräte mit einer UV-Lampe und Kamera ausgestattet wurden und die Fluoreszenz des zur PCR-Reaktion gegebenen Ethidiumbromids nach Interkalation mit der DNA quantitativ erfasst werden konnte. Den ersten Real-time-Thermocycler brachte 1996 die Firma Applied Biosystems mit dem ABI Prism 7700 auf den Markt (137),

kurz darauf folgte die Erstbeschreibung des LightCyclers 1997 durch Witttwer et al. (142), wofür Roche die Lizenz von Idaho Technology erworben hatte.

Derzeit bieten zwölf verschiedene Hersteller Real-time Geräte an (Stand 03/2007), deren Zahl in Zukunft sicherlich noch ansteigen wird: AlphaHelix, Applied Biosystems, Barloword Scientific, Bioneer, BioRad, Corbett Tobotics, Cepheid, Eppendorf, Idaho Technologies, MJ Research, Roche Diagnostics und Stratagene.

Die weite Verbreitung der Real-time Systeme hat in den letzten Jahren zu einem rasanten Anstieg der Applikationsmöglichkeiten im Rahmen klinischer Anwendungen in der Mikrobiologie geführt: Vor allem in der Virologie und Bakteriologie wurden zahlreiche Real-time PCR-Assays für die Diagnostik entwickelt, die die Vorteile der Sensitivität, Spezifität und Schnelligkeit dieser molekularbiologischen Technik gegenüber den konventionellen Methoden hervorheben (124). Im Bereich der Parasitologie und Mykologie ist die Verwendung von Real-time Verfahren zu diagnostischen Zwecken hingegen bisher noch weniger verbreitet. So wird zwar der Nachweis von verschiedenen *Aspergillus*-, *Candida*-, *Coccidioides*- und *Fusarium*-Spezies mittels Real-time PCR auch im Hybridisierungssondenformat mit anschließender Schmelzkurvenanalyse beschrieben (16, 20, 58, 83, 92), jedoch sind bislang lediglich insgesamt zwei Arbeiten veröffentlicht, die die Anwendung des LightCyclers bei Dermatophyten untersuchten (47, 131).

In beiden Untersuchungen zu Dermatophyten wurde das SYBR-Green-Detektionsformat mit einer sich anschließenden Schmelzkurvenanalyse verwendet. Bei Gutzmer et al. (47) konnte damit allerdings keine Spezies-Unterscheidung zwischen einzelnen Dermatophyten vorgenommen werden, da die Differenzen zwischen den individuellen Schmelztemperaturen mit 0,1-1,4 °C bei Fehlerbereichen von bis zu ± 0,92 °C keine aussagekräftige Differenzierung zuließen. Für Mutationsanalysen wird ein Mindestabstand zwischen zwei Schmelzkurvenpeaks von 4-5 °C gefordert, um eine sinnvolle Trennung vornehmen zu können (108), was mit dem hier entwickelten Assay mit einer Temperaturdifferenz von 11 °C zwischen *T. rubrum* und *T. interdigitale* verwirklicht wurde.

Das Hybridisierungssonden-Format am LightCycler wurde in dieser Arbeit das erste Mal an Dermatophyten angewandt und vereint die Vorteile der Real-time PCR mit einer molekularbiologischen Sofortdiagnostik von *T. rubrum, T. interdigitale* und *M. canis* aus nativen Patientenproben. Insbesondere die Schmelzkurvenanalyse, wie sie erstmalig bei Ririe et al. (106) beschrieben wurde, eignet sich für eine Spezies-spezifische Detektion von Erregern, da hierbei das amplifizierte Produkt über seine spezifische Schmelztemperatur T_m direkt visualisiert und identifiziert werden kann. Eine nachträgliche Verunreinigung im Anschluss an die

PCR kann mit diesem geschlossenen, homogenen System ausgeschlossen werden. Ferner werden die Ergebnis-Daten elektronisch gespeichert und sind jederzeit wieder abrufbar. Weitere Vorteile der Real-time PCR am LightCycler sind neben den kurzen Analysezeiten von etwa 45 min je PCR-Lauf im Vergleich zum 5-stündigen PCR-ELISA-Assay der deutlich reduzierte Arbeitsaufwand, da die umfangreichen Pipettierschritte des ELISA entfallen, sowie die Möglichkeit, eine Multiplex-PCR mit nur einem Primer-/Sonden-Set für die beiden Dermatophyten-Spezies *T. rubrum* und *T. interdigitale* durchzuführen, was die Interferenz zwischen Primer und Sonden minimiert. Im Vergleich zur PCR-ELISA liegt die Sensitivität der LightCycler-PCR mit 0,0001 µg/ml DNA nochmals um eine Zehnerpotenz höher, was sich möglicherweise allerdings auch in einer erhöhten Anzahl an falsch-positiven Proben ausdrücken kann, die auf Verunreinigungen bei der Probenvorbereitung zurückzuführen sind (125). Durch die Verwendung von Negativkontrollen sowie eines organisierten Arbeitsablaufes mit getrennten Räumlichkeiten für die mikrobiologische Probenvorbereitung und die PCR-Reaktionen konnten Kontaminationen sicherlich nicht vollkommen ausgeschlossen, zumindest jedoch stark eingeschränkt werden. Außerdem stellen Verunreinigungen mit unspezifischer DNA im Hybridisierungssonden-Format kein Problem dar, da die Primer- und Sonden-Sets spezifisch nur die passenden Nukleotidsequenzen amplifizieren bzw. nachweisen.

Falsch-negative Proben hingegen können durch Polymeraseinhibitoren verursacht werden und wurden im vorliegenden Assay nicht durch interne Kontrollen kontrolliert. Ein weiterer Nachteil der Real-time PCR am LightCycler ist die fehlende Kontrolle der Amplikon-Größen. Zur Überprüfung der amplifizierten Proben wurde hierzu eine Trennung mittels Gelelektrophorese im Agarose-Gel im Anschluss an die Real-time PCR herangezogen, um eine mögliche Fehlerfindung während der Entwicklung des Assays zu ermöglichen.

Die bei der Real-time PCR anfallenden Kosten und der Vergleich mit anderen molekularbiologischen Methoden werden im folgenden Kapitel 0 diskutiert.

Die Schmelzkurvenanalyse im Hybridisierungssonden-Format findet breite Anwendung bei der Typisierung von Sequenzvariationen. Dies können einzelne Basenaustausche, Deletionen und Insertionen, aber auch sonstige Variationen wie Splice-Varianten oder verwandte Sequenzen sein. Beispielhaft sei hier die erste Beschreibung einer Mutationsanalyse des Faktor-V-Leidens aus dem Jahr 1997 genannt (79), bei der ein einziger Basenaustausch mittels einer Fluorescein-gelabelten Hybridisierungssonde und eines mit dem Farbstoff Cy5 markierten Primer detektiert werden konnte.

Das in dieser Arbeit entwickelte Real-time PCR-Verfahren ähnelt sehr stark einer Mutationsanalyse, da auch hier einzelne Basenaustausche eng verwandter Sequenzen zur Differenzierung herangezogen werden. Allerdings wurde das zum Sondendesign empfohlene Prinzip der Sensor- und der benachbarten, höher schmelzenden Anker-Sonde nicht im strengen Sinne verwirklicht: Die Sensor-Sonde soll hierbei die variable Sequenz überdecken, die Anker-Sonde hingegen befindet sich in einem nicht-variablen Bereich (107). In der Analyse der Schmelzpunkte wird nur die Sensor-Sonde erfasst, da sie niedriger schmelzend ist, wobei eine Basenmutation alleine eine Änderung von 2-10 °C, abhängig von der Art des Austausches, verursacht (127).

Im vorliegenden Assay wurde versucht, zunächst eine Spezies-spezifische Detektion für nur zwei Dermatophyten-Spezies zu entwickeln, die keine Kreuzreaktionen mit anderen Arten ermöglicht. Hierfür reicht eine einzelne Basenmutation jedoch nicht aus, weshalb Sequenzabschnitte herangezogen wurden, die reich an Variationen in den Sequenzen verschiedener Dermatophyten-Spezies sind. Sowohl Sensor- als auch Anker-Sonde überdecken dabei die variablen Sequenzmotive und führen zu einer guten Trennung zwischen *T. rubrum* und *T. interdigitale*. Da der Upstream-Primer A1 allerdings ebenfalls auf einer variablen Sequenz lag und *M. canis* damit nicht amplifiziert wurde, konnte nur *T. rubrum* und *T. interdigitale* in einer Multiplex-Reaktion erfasst werden. Für *M. canis* wurde deshalb ein eigener Upstream-Primer (A5) etabliert, um einen möglichen Befall mit diesem Erreger in einer separaten Real-time PCR zu untersuchen. Für das Primer-/Sonden-Design war bei der Fülle an womöglich interagierenden Dermatophyten die Suche nach den passenden Sequenzmotiven eine Herausforderung, um sowohl Primer- als auch Sondenbindungsstellen in relativ begrenzten Abschnitten auf dem Topoisomerase-II-Gen zu platzieren.

Die Problematik der zum *T. mentagrophytes*-Komplex zugehörigen Spezies stellte sich ähnlich wie bei den PCR-ELISA-Untersuchungen dar:

Eine sinnvolle Differenzierung zwischen *T. interdigitale*, *T. rubrum* und *M. canis* sowie die Vermeidung von falsch-positiven Kreuzreaktionen zu anderen dermatologisch relevanten Pilzen wie *Candida*-Spezies oder dem nagelpathogenen Schimmelpilz *Scopulariopsis brevicaulis* war nur durch einen Kompromiss zu Lasten der Differenzierung zwischen den verschiedenen zum *T. mentagrophytes*-Komplex gehörenden Spezies möglich: So wurde eine Gensequenz auf dem Topoisomerase-II-Gen gewählt, die eine Diskriminierung zwischen *T. intedigitale* und *T. tonsurans* nicht zuließ, jedoch sicher falsch-positive Kreuzreaktionen zu *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *S. brevicaulis*, sowie anderen Dermatophyten-Spezies, wie *T. rubrum*, *M. canis* und *E. floccosum* ausschloss. Ein falsch-positiver *T. rubrum*-Nachweis

bei Befall mit *T. violaceum* konnte aufgrund der identischen Sondenbindungssequenz nicht ausgeschlossen werden. Da eine taxonomische Einteilung insbesondere des *T. mentagrophytes*-Komplexes auch zukünftig immer wieder Änderungen unterworfen sein wird, ferner *Trichophyton*-Arten wie *T. tonsurans* und *T. violaceum* in der mykologischen Routinediagnostik eine eher untergeordnete Rolle spielen, wurde eine molekularbiologische Diagnostik etabliert, die eine Identifizierung und Differenzierung der in der Dermatologie wichtigsten Dermatophyten-Arten ermöglicht, gleichzeitig jedoch mit geringem Zeitaufwand, reproduzierbaren und einfach anzuwendenden Techniken weitaus höhere Detektionsraten als bei konventionellen Methoden erzielt (siehe 0).

Kostenvergleich

Der konventionellen Dermatophyten-Diagnostik stehen mit 2,36 € Materialkosten je Patientenprobe Einnahmen von 26,80 € nach dem einfachen Gebührensatz nach GOÄ (Stand 03/2007) gegenüber. Die Real-time PCR am LightCycler ist mit 9,96 € Kosten je Probe erstaunlicherweise billiger als eine molekularbiologische Untersuchung mittels PCR-ELISA mit 13,08 €. Berücksichtigt werden müssen jedoch die Anschaffungskosten für den LightCycler sowie einen angeschlossenen PC im Vergleich zu einem deutlich günstigeren Thermocycler, der für die PCR-ELISA-Methode benötigt wird.

Oligozentrische Studie

Die mykologische Labordiagnostik ist eine grundlegende Voraussetzung für ein optimales Management von Dermatophytosen. Im Rahmen einer dermatologischen Untersuchung kommt der mykologischen Diagnostik deshalb größte Bedeutung zu. Ziel muss eine möglichst frühzeitige Differenzierung einschließlich der Identifizierung auf Gattungs- wie Artebene sein, um ein Aufdecken der Infektionsquelle und darauf aufbauend die Vermeidung einer möglichen Reinfektion sowie eine gezieltere Therapie mit Antimykotika zu ermöglichen. Angesichts der beständigen Pathomorphose und des Erregerwandels ist eine kontinuierliche Optimierung der mykologischen Labordiagnostik unumgänglich. Die Indikation eines Erregernachweises ist deshalb auch in Zeiten wirtschaftlicher Sparmaßnahmen eher weiter denn enger zu stellen, um schwerwiegende und teure Fehldiagnosen zu vermeiden (7).

Die oligozentrische Studie in München, Neu-Ulm und Tübingen diente zum einen der Gegenüberstellung konventioneller und in dieser Arbeit etablierter molekularbiologischer Diagnostik-Methoden bei Dermatophyten, zum anderen einem Vergleich der Anwendbarkeit der neu entwickelten Assays sowohl in der klinischen Routine als auch im Labor einer Hautarzt-Gemeinschaftspraxis.

PCR-ELISA

Der direkte mikroskopische Nachweis von Pilzelementen im Mikroskop in Kombination mit einem Kulturpräparat gilt derzeit noch als „Goldstandard“ in der mykologischen Diagnostik zur Identifizierung von Dermatophyten (47, 80, 85, 100, 134). Allerdings werden für das Nativpräparat falsch-negative Ergebnisse in 5-15 % aller Onychomykose-Fälle bei Elewski et al. und Rippon angegeben (29, 105). Im Falle einer Untersuchung mit KOH-DMSO beträgt die Sensitivität des Mikroskop-Präparates in einer Studie an 204 Patienten mit Onychomykose bei Lilly et al. (80) nur 79,5 %, bei Weinberg et al. (134) wird sie mit 80 % beschrieben.

Für die Identifizierung mittels Kultur fanden Lawry et al. (78) Sensitivitätsraten von 23-32 %, Weinberg et al. (134) von 59 % und Lilly et al. (80) von 79,3 %.

Mit Detektionsraten von 56,0 % in München bzw. 63,5 % in Tübingen lagen die Werte für die Kulturpräparate in diesem Rahmen. Betrachtet man die Onychomykose allein, wiesen sogar nur 45,8 % bzw. 54,9 % des Untersuchungsmaterials ein positives Kulturergebnis auf, was einerseits durch die stabile Nagelstruktur erklärbar wird, in die die Pilzelemente oftmals in zahlreichen Hohlräumen eingeschlossen sind, andererseits sind lebende Dermatophyten vorzugsweise an der Grenze zwischen mykotischer Veränderung und gesunder Restnagelplatte

zu finden, so dass eine Materialentnahme an ungeeigneten Stellen mit überwiegend toten Pilzerregern im Kulturpräparat zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann. Der Vorteil der genanalytischen PCR-ELISA-Methode ist gerade bei der Onychomykose klar herauszuheben: Basierend auf der Analyse von Dermatophyten-DNA spielt die Vitalität der Erreger keine Rolle, die Detektionsraten waren mit 79,1 % deutlich höher als in der Kultur. Signifikante Unterschiede zwischen Tinea unguium und Tinea pedis zeigten sich nur in der Kultur, nicht jedoch im PCR-ELISA-Assay (siehe 0).

In der oligozentrischen Studie wurde für alle Proben aus München und Tübingen gesamthaft betrachtet eine statistisch signifikante Überlegenheit der molekularbiologischen Methode im Vergleich mit der konventionellen Kulturdiagnostik deutlich (79,9 % vs. 59,8 %).

Unter dem Gesichtspunkt der praktischen Anwendbarkeit der entwickelten Technik sind die Ergebnisse aus der Gemeinschafts-Hautarztpraxis Bezold/Gottlöber in Neu-Ulm zu bewerten: Da keine Vorauswahl an nativ-positiven und -negativen Proben vorgenommen wurde, ergibt sich aus dem Verhältnis zur relativen großen Probenanzahl von 316 Patientenproben ein positiver Nachweis einer Dermatophytose bei jeder vierten Patientenprobe (25,0 %) im PCR-ELISA. Nur 7,3 % aller Proben waren hingegen kulturell auf eine der untersuchten Dermatophyten-Spezies positiv, was die Problematik von Pilzkulturen in der Praxisdiagnostik aufzeigt: In mykologischen Labors gehören Pilzkulturen zu den Routineaufgaben des im Umgang mit Dermatophyten erfahrenen Personals, in einer Praxis stellen Pilzerkrankungen jedoch nur einen schmalen Ausschnitt aus dem täglichen Arbeitsspektrum dar und der Aufwand für Kulturen kann dementsprechend nicht den zeitlichen Raum einnehmen, der in der Klinik dafür verwandt wird.

In besonderem Ausmaß zeigt sich dadurch der Vorteil der molekularbiologischen Methode: 55 Dermatophytose-Fälle konnten allein durch die PCR-ELISA bestätigt werden, dies entspricht einer Steigerung um 229 % im Vergleich zur Kultur. Außerdem wurden 10 Patientenproben mit einer Doppelbesiedlung erkannt, die in der Kultur nicht aufschienen.

Da im Labor der Hautarztpraxis Bezold/Gottlöber PCR-ELISA-Nachweise für dermatologisch relevante Erreger wie das Epstein-Barr-Virus (EBV), Humanpapillomaviren (HPV), Herpes-simplex-Virus (HSV), Varizella-Zoster-Virus (VZV), *Sarcoptes scabiei* sowie weitere Mikroorganismen etabliert waren, fügte sich der Dermatophyten-Nachweis problemlos in das Laborschema ein und verursachte nur wenig zusätzlichen Aufwand.

PCR-ELISA-Techniken finden bisher vor allem im Bereich der Virusdiagnostik qualitative und quantitative Anwendung. So sind Hybridisierungs-Assays auf der Basis des verwendeten Dig-Detection-Systems auf Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten für die Detektion von

Adenoviren (91), Parvovirus B19 (19), EBV (6), Hepatitis B Viren (74), Humane Herpesviren 8 (HHV8) (12), HPV (48, 102), HSV (9, 13), VZV (14), daneben aber auch für bakterielle Mikroorganismen wie MRSA (23), *Escherichia coli* (32, 35), *Enterococcus faecalis* (133) oder parasitäre Erreger wie *Leishmania infantum* (10, 89), *Sarcoptes scabiei* (11) oder *Trypanosoma evansi* (22) beschrieben. Mykologische PCR-ELISA-Assays wurden vorwiegend für *Aspergillus*- und *Candida*-Spezies entwickelt (119, 84), im Bereich der Dermatophyten wird mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode Neuland betreten, da bislang keinerlei Literatur hierzu veröffentlicht ist.

In Deutschland dominierten in den 1920er-Jahren die Arten *Epidermophyton floccosum* und *Microsporum audouinii* mit 42 bzw. 25 % das Erregerspektrum bei den Dermatophytosen (90). Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts setzte eine bemerkenswerte Veränderung ein: Der Anteil an *T. rubrum*- und *T. mentagrophytes*-Infektionen stieg deutlich an und erreichte in den 1980er-Jahren Werte von 73,9 bzw. 19 % (30). Dieser Trend bestätigte sich auch in der oligozentrischen Studie: 78,9 % aller PCR-positiven Patientenproben wiesen *T. rubrum* und 12,0 % *T. interdigitale* auf. Die Dominanz der anthropophilen Erreger sowie die Verbreitung der Tinea pedis insbesondere bei bestimmten Berufsgruppen lässt sich durch exogene wie auch individuelle Faktoren epidemiologisch erklären: Berufe, für die das tägliche Duschen nach der Arbeit in Gemeinschaftsanlagen oder aber auch das Tragen von Gummistiefeln typisch ist, zeigen eine hohe Inzidenz der Tinea pedis (120). Neben Risikofaktoren wie familiäre Disposition, Fußfehlstellungen, Traumen, periphere Neuropathien, Diabetes mellitus und Durchblutungsstörungen spielt das geänderte Freizeitverhalten im Zeitalter der Spaßbäder und Fitnesssportarten eine wichtige Rolle bei der Dermatophytenverbreitung (121). Durch verstärkte Reiseaktivität und Immigration aus „endemischen Regionen“ wird in den letzten Jahren häufiger über exotische Dermatophyten-Spezies wie *T. soudanense* oder *T. violaceum* berichtet (52). Mit insgesamt zehn identifizierten *T. violaceum*-Fällen (4,1 %) hat diese Art ihren Status in Deutschland als „Exot“ allerdings bereits verlassen und scheint in Zukunft häufiger als Erreger einer Dermatophytose in Betracht gezogen werden zu müssen.

Mit der PCR-ELISA-Technik konnte eine zuverlässige, schnelle und günstige Routinediagnostik für fünf wichtige Dermatophyten-Spezies etabliert werden. Mit einer deutlich höheren Detektionsrate als mittels Pilzkultur, der raschen Diagnosestellung innerhalb von 24 Stunden und der eindeutigen Ergebnisinterpretation unabhängig von interpretierbaren morphologischen Kriterien bietet diese mikrobiologische Methode einen deutlichen Fortschritt gegenüber der konventionellen Diagnostik.

Real-time PCR

Die Ergebnisse aus der Analyse der Münchner Proben mittels LightCycler verdeutlichen das Potential dieser genanalytischen Identifizierung von Dermatophyten: Mit einer Sensitivität von 89,8 % gegenüber 80,6 % im PCR-ELISA und 57,1 % in der Kultur konnte eine deutlich empfindlichere Methode zur Diagnostik von Dermatophytosen etabliert werden. Der statistisch hoch signifikante Unterschied ($p<0,005$) zwischen LightCycler- und Kultur-Diagnostik ermöglichte eine aussagekräftige und sensitive Analyse von nativen Patientenproben, die zudem eine Zeitersparnis von etwa vier Stunden sowie eine deutliche Reduzierung des Arbeitsaufwandes gegenüber der PCR-ELISA brachte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl Pilzerkrankungen seit über 150 Jahren bekannt sind, gehören Hautmykosen immer noch zu den weltweit häufigsten Infektionskrankheiten. Dermatophytosen beeinträchtigen die Lebensqualität der Betroffenen oft erheblich, zählen zudem auch zu bedeutsamen Risikofaktoren für Folgeerkrankungen, wie sie vor allem die Tinea pedis für das Unterschenkelerysipel darstellt. Eine möglichst frühzeitige Erregerdifferenzierung auf Artebene muss Grundlage jeder mykologischen Labordiagnostik im Rahmen eines optimalen Managements von Dermatomykosen sein, um zum einen Veränderungen des Erregerspektrums erfassen, Infektionsquellen aufdecken und verfolgen zu können, zum anderen gezielte Behandlungsmaßnahmen einzuleiten, sowie ein Ansprechen der Erreger und einen möglichen Erregerwechsel unter der Therapie zu beobachten.

Klassische Differenzierungsverfahren umfassen mikroskopische, kulturelle und verschiedene histologische Untersuchungsmethoden. Aufgrund von oftmals schwierig abzugrenzenden morphologischen Artunterschieden, von nicht immer reproduzierbaren physiologischen Merkmalen und von auftretenden Pleomorphismen bei Dermatophyten stoßen die konventionellen Methoden der Labordiagnostik jedoch häufig an Grenzen.

Zielsetzung dieser Arbeit war deshalb die Etablierung einer routinemäßig einsetzbaren, molekularen Sofortdiagnostik von Dermatophyten aus nativem Patientenmaterial mittels Polymerasekettenreaktion, die die Vorteile einer Diagnostik auf DNA-Ebene vereint: Neben der Unabhängigkeit von distinkten morphologischen Veränderungen und Entwicklungsstadien der Erreger sollte ein weiteres Hauptaugenmerk auf die Verbesserung von Schnelligkeit, Sensitivität und Spezifität bisheriger Diagnose-Techniken gelegt und die Möglichkeit geschaffen werden, Dermatophyten direkt aus Patientenmaterial nachzuweisen.

Die DNA-Isolierung erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskit auf Basis von Silikat-Matrix-Säulen. Mit Hilfe der entwickelten PCR-ELISA-Methode konnten die fünf häufigsten Dermatophyten-Arten *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *T. violaceum*, *M. canis* und *E. floccosum* innerhalb von 24 Stunden nach Probennahme identifiziert werden. Im Rahmen einer oligozentrischen Studie in München, Neu-Ulm und Tübingen wurde die Alltagstauglichkeit des molekulargenetischen Assays in der Routinediagnostik sowohl im klinisch-mykologischen Labor als auch im Labor einer Hautarzt-Gemeinschaftspraxis unter Beweis gestellt. Eine Weiterentwicklung dieser PCR-gestützten Technik erfolgte mittels Real-time PCR im Hybridisierungssondenformat und anschließender Schmelzkurvenanalyse am

LightCycler zur Identifizierung der Dermatophyten-Spezies *T. rubrum*, *T. interdigitale* und *M. canis*.

Die Ergebnisse aus der oligozentrischen Studie zeigten eine statistisch signifikante Überlegenheit der molekulargenetischen Diagnosemethoden: Mit einer Sensitivität von 89,8 % mit der Real-time PCR und 79,9 % mittels PCR-ELISA konnten hoch empfindliche molekularbiologische Techniken etabliert werden, die eine deutliche Verbesserung gegenüber der konventionellen Kulturdiagnostik mit einer Sensitivität von 59,8 % in den klinischen Proben erzielten.

Durch die rasche Diagnosestellung innerhalb von 24 Stunden im PCR-ELISA und 20 Stunden mit Hilfe der Real-time PCR konnten schnelle und reproduzierbare Differenzierungsmethoden für die Routinediagnostik etabliert werden, die praktikable Alternativen zum Kulturpräparat darstellten und eine genetische Identifizierung auf Artebene aus nativem Patientenmaterial unabhängig von der Vitalität der Erreger ermöglichten.

Die Vielfalt unterschiedlicher Dermatophyten-Spezies und -Varianten sowie die dynamischen Veränderungen des Erregerspektrums bieten noch große Herausforderungen, molekulargenetische Diagnosetechniken weiterzuentwickeln. Die in dieser Arbeit etablierten PCR-basierten Methoden zur Sofortdiagnostik von Dermatophyten schaffen weiterhin die Grundlage für eine Erweiterung des erfassbaren Erregerspektrums, ferner einer Steigerung der Sensitivität und Spezifität. Weiters werden fortschreitende Techniken im Bereich der DNA-Extraktion, der verschiedenen PCR-Anwendungen, insbesondere auf dem Gebiet der Real-time PCR, sowie die neuen Möglichkeiten der Microarray-Analysen wesentliche Beiträge zu zukünftigen dermatomykologischen Fragestellungen leisten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abeck D, Haneke E, Nolting S, Reinel D, and Seebacher C (2000) Onychomykose: Aktuelle Daten zu Epidemiologie, Erregerspektrum, Risikofaktoren sowie Beeinflussung der Lebensqualität. Dtsch Ärztebl 97: 1984-1986.

2. Ajello L and Georg LK (1957) In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of Trichophyton mentagrophytes and Trichophyton rubrum. Mycopathol Mycol Appl 8: 3-17.

3. Baek SC, Chae HJ, Houh D, Byun DG, and Cho BK (1998) Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and restriction enzyme analysis. Int J Dermatol 37: 682-686.

4. Bastert J and Korting HC (1999) Diagnostische Methoden zur Spezies-spezifischen Differenzierung unterschiedlicher Dermatophyten. Mycoses 42 Suppl 1: 73-79.

5. Bastert J, Korting HC, Traenkle P, and Schmalreck AF (1999) Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). Mycoses 42: 525-528.

6. Bazzichi A, Guidi FV, Rindi L, Incaprera M, and Garzelli C (1998) PCR ELISA for the quantitative detection of Epstein-Barr virus genome. J Virol Methods 74: 15-20.

7. Beifuss B, Borelli C, and Korting HC (2006) Mykologisches Labor. Hautarzt.

8. Bezold G (2001) Habilitationsschrift der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm: Möglichkeiten der Polymerasekettenreaktion in der dermatologischen Diagnostik. Dissertation.

9. Bezold G, Gottlöber P, Leiter U, Kerscher M, Krahn G, and Peter RU (2000) Quantitation of herpes simplex DNA in blood during aciclovir therapy with competitive PCR ELISA. Dermatology 201: 296-299.

10. Bezold G, Lange M, Gethoffer K, Pillekamp H, Reindl H, Richter C, Schonian G, Weber L, and Peter RU (2001) Competitive polymerase chain reaction used to diagnose cutaneous leishmaniasis in German soldiers infected during military exercises in French Guiana. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20: 421-424.

11. Bezold G, Lange M, Schiener R, Palmedo G, Sander CA, Kerscher M, and Peter RU (2001) Hidden scabies: diagnosis by polymerase chain reaction. Br J Dermatol 144: 614-618.

12. Bezold G, Messer G, Peter R, Flaig M, and Sander C (2001) Quantitation of human herpes virus 8 DNA in paraffin-embedded biopsies of HIV-associated and classical Kaposi's sarcoma by PCR. J Cutan Pathol 28: 127-130.

13. Bezold G, Volkenandt M, Gottlöber P, and Peter RU (2000) Detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus in clinical swabs: frequent inhibition of PCR as determined by internal controls. Mol Diagn 5: 279-284.

14. Bezold GD, Lange ME, Gall H, and Peter RU (2001) Detection of cutaneous varicella zoster virus infections by immunofluorescence versus PCR. Eur J Dermatol 11: 108-111.

15. Bibel DJ and Smiljanic RJ (1979) Interactions of Trichophyton mentagrophytes and micrococci on skin culture. J Invest Dermatol 72: 133-137.

16. Binnicker MJ, Buckwalter SP, Eisberner JJ, Stewart RA, McCullough AE, Wohlfiel SL, and Wengenack NL (2007) Detection of Coccidioides species in clinical specimens by real-time PCR. J Clin Microbiol 45: 173-178.

17. Bock M, Maiwald M, Kappe R, Nickel P, and Näher H (1994) Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus-specific primer system. Mycoses 37: 79-84.

18. Bock M, Nickel P, Maiwald M, Kappe R, and Näher H (1997) Diagnostik von Dermatomykosen mit der Polymerase-Kettenreaktion. Hautarzt 48: 175-180.

19. Bonvicini F, Filippone C, Manaresi E, Gentilomi GA, Zerbini M, Musiani M, and Gallinella G (2006) Peptide nucleic acid-based in situ hybridization assay for detection of parvovirus B19 nucleic acids. Clin Chem 52: 973-978.

20. Brandfass C and Karlovsky P (2006) Simultaneous detection of Fusarium culmorum and F. graminearum in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. BMC Microbiol 6: 4.

21. Brasch J (2004) Bewährte und neue Verfahren zur Differenzierung von Dermatophyten. Hautarzt 55: 136-142.

22. Chansiri K, Khuchareontaworn S, and Sarataphan N (2002) PCR-ELISA for diagnosis of Trypanosoma evansi in animals and vector. Mol Cell Probes 16: 173-177.

23. Daeschlein G, Assadian O, Daxboeck F, and Kramer A (2006) Multiplex PCR-ELISA for direct detection of MRSA in nasal swabs advantageous for rapid identification of non-MRSA carriers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 25: 328-330.

24. Dahl MV and Grando SA (1994) Chronic dermatophytosis: what is special about Trichophyton rubrum? Adv Dermatol 9: 97-109.

25. Dawson CO and Gentles J (1959) Perfect stage of Keratinomyces ajelloi. Nature 183: 1345-1346.

26. Duek L, Kaufman G, Palevsky E, and Berdicevsky I (2001) Mites in fungal cultures. Mycoses 44: 390-394.

27. Dutcher JD (1968) The discovery and development of amphotericin B. Dis Chest 54: Suppl-8.

28. El Fari M, Tietz HJ, Presber W, Sterry W, and Gräser Y (1999) Development of an oligonucleotide probe specific for Trichophyton rubrum. Br J Dermatol 141: 240-245.

29. Elewski BE (1997) Large-scale epidemiological study of the causal agents of onychomycosis: mycological findings from the Multicenter Onychomycosis Study of Terbinafine. Arch Dermatol 133: 1317-1318.

30. Elsner P, Hartmann AA, and Kohlbeck M (1987) Dermatophytoses in Würzburg 1976-1985. Mykosen 30: 584-588.

31. Epstein E (1998) How often does oral treatment of toenail onychomycosis produce a disease-free nail? An analysis of published data. Arch Dermatol 134: 1551-1554.

32. Fach P, Perelle S, Dilasser F, and Grout J (2001) Comparison between a PCR-ELISA test and the vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing Escherichia coli in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. J Appl Microbiol 90: 809-818.

33. Faggi E, Pini G, and Campisi E (2002) PCR fingerprinting for identification of common species of dermatophytes. J Clin Microbiol 40: 4804-4805.

34. Faggi E, Pini G, Campisi E, Bertellini C, Difonzo E, and Mancianti F (2001) Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. J Clin Microbiol 39: 3382-3385.

35. Ge B, Zhao S, Hall R, and Meng J (2002) A PCR-ELISA for detecting Shiga toxin-producing Escherichia coli. Microbes Infect 4: 285-290.

36. Gendatenbank. http://srs.ebi.ac.uk/ . 2007.

37. Gentles J (1958) Experimental ringworm in guinea pigs: oral treatment with griseofulvin. Nature 182: 476-477.

38. Gold W, Stout HA, Pagano JF, and Donovick R (1956) Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. Antibiotic Ann 1955-1956: 579-586.

39. Gräser Y. http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/graeser-yvonne-2002-03-26/HTML/chapter1.html . 2002.

40. Gräser Y (2002) Molekulare Systematik und Evolution der Spezies der Familie Arthrodermataceae (Dermatophyten). Dissertation. Humboldt-Universität Berlin.

41. Gräser Y, De Hoog S, and Summerbell RC (2006) Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. Med Mycol 44: 199-209.

42. Gräser Y, El Fari M, Presber W, Sterry W, and Tietz HJ (1998) Identification of common dermatophytes (Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton) using polymerase chain reactions. Br J Dermatol 138: 576-582.

43. Gräser Y, El Fari M, Vilgalys R, Kuijpers AF, de Hoog GS, Presber W, and Tietz H (1999) Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. Med Mycol 37: 105-114.

44. Gruby D (1841) Mémoire sur une végétation qui constituent la vraie teigne. C R Acad Sci 13: 72-75.

45. Gruby D (1841) Sur les mycodermes qui constituent la teigne faveuse. C R Acad Sci 13: 309-312.

46. Gruby D (1843) Recherches sur la nature, le siège et le développement du porrigo decalvans ou phytoalpécie. C R Acad Sci 17: 301-302.

47. Gutzmer R, Mommert S, Kuttler U, Werfel T, and Kapp A (2004) Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. J Med Microbiol 53: 1207-1214.

48. Haas S, Park TW, Voigt E, Buttner R, and Merkelbach-Bruse S (2005) Detection of HPV 52, 58 and 87 in cervicovaginal intraepithelial lesions of HIV infected women. Int J Mol Med 16: 815-819.

49. Haase G, Borg-von Zepelin H, Bernhardt W, Fegeler W, Harmsen D, Kappe R, Korting HC, Kuijpers A, Rüchel R, Schaller M, Schmalreck A, Seebacher C, and Tintelnot K (2001) Pilzinfektionen Teil I - Präanalytik, Analytik. In: Mauch H and Lütticken R, editors, MiQ 14. München; Jena: Urban & Fischer, 9-88.

50. Haase G, Borg-von Zepelin H, Bernhardt W, Fegeler W, Harmsen D, Kappe R, Korting HC, Kuijpers A, Rüchel R, Schaller M, Schmalreck A, Seebacher C, and Tintelnot K (2001) Pilzinfektionen Teil II - Spezielle Pilzdiagnostik. In: Mauch H and Lütticken R, editors, MiQ 15. München; Jena: Urban & Fischer, 47-91.

51. Hay RJ (2003) Cutaneous and Subcutaneous Mycoses. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, and Pfaller MA, editors, Clinical Mycology. Philadelphia: Churchill Livingstone, 456-473.

52. Hay RJ, Robles W, Midgley G, and Moore MK (2001) Tinea capitis in Europe: new perspective on an old problem. J Eur Acad Dermatol Venereol 15: 229-233.

53. HAZEN EL and BROWN R (1950) Two antifungal agents produced by a soil actinomycete. Science 112: 423.

54. Herbst RA, Brinkmeier T, and Frosch PJ (2003) Histologische Diagnose der Onychomykose. J Dtsch Dermatol Ges 1: 177-180.

55. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, and Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology 10: 413-417.

56. Hiruma M and Yamaguchi H (2003) Dermatophytes. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, and Pfaller MA, editors, Clinical Mycology. 370-379.

57. Hof H (2003) Mykologie für Mediziner. 1. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

58. Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, Chen YC, Liao MH, Lin YH, and Li SY (2003) Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. J Med Microbiol 52: 1071-1076.

59. Huey B and Hall J (1989) Hypervariable DNA fingerprinting in Escherichia coli: minisatellite probe from bacteriophage M13. J Bacteriol 171: 2528-2532.

60. Jackson CJ, Barton RC, and Evans EG (1999) Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. J Clin Microbiol 37: 931-936.

61. Jackson CJ, Barton RC, Kelly SL, and Evans EG (2000) Strain identification of Trichophyton rubrum by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. J Clin Microbiol 38: 4527-4534.

62. Jackson CJ, Mochizuki T, and Barton RC (2006) PCR fingerprinting of Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale using polymorphic subrepeat loci in the rDNA nontranscribed spacer. J Med Microbiol 55: 1349-1355.

63. Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Mignon B, Reichard U, Barblan J, Quadroni M, and Monod M (2004) Secreted subtilisin gene family in Trichophyton rubrum. Gene 339: 79-88.

64. Kac G (2000) Molecular approaches to the study of dermatophytes. Med Mycol 38: 329-336.

65. Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Fujihiro M, and Kikuchi A (2003) PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. J Dermatol Sci 32: 151-161.

66. Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Kawasaki M, Fujihiro M, and Kikuchi A (2003) Species-identification of dermatophytes Trichophyton, Microsporum and Epidermophyton by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. J Dermatol Sci 33: 41-54.

67. Kano R, Hirai A, and Hasegawa A (2002) Chitin synthase 1 gene of Arthroderma benhamiae isolates in Japan. Mycoses 45: 277-281.

68. Kano R, Hirai A, Muramatsu M, Watari T, and Hasegawa A (2003) Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase 1 (CHS1) gene. J Vet Med Sci 65: 267-270.

69. Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, and Hasegawa A (2000) Detection of Microsporum canis in the skin scrapings and hairs of dogs with dermatophytosis based on sequences of the chitin synthase 1 gene. Microbiol Immunol 44: 605-607.

70. Kano R, Nakamura Y, Watari T, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H, and Hasegawa A (1998) Molecular analysis of chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences of Trichophyton mentagrophytes complex and T. rubrum. Curr Microbiol 37: 236-239.

71. Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, Devliotou-Panagiotidou D, Sotiriou E, and Gräser Y (2006) Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of Trichophyton rubrum strains. J Clin Microbiol 44: 1419-1427.

72. Kick G and Korting HC (2001) The definition of Trichophyton rubrum syndrome. Mycoses 44: 167-171.

73. Kim JA, Takahashi Y, Tanaka R, Fukushima K, Nishimura K, and Miyaji M (2001) Identification and subtyping of Trichophyton mentagrophytes by random amplified polymorphic DNA. Mycoses 44: 157-165.

74. Kim JW, Shim JH, Park JW, Jang WC, Chang HK, Song IH, Baek SY, Lee SH, Yoon DY, and Park SN (2005) Development of PCR-ELISA for the detection of hepatitis B virus x gene expression and clinical application. J Clin Lab Anal 19: 139-145.

75. Korting HC, Ollert M, and Abeck D (1995) Results of German multicenter study of antimicrobial susceptibilities of Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes strains causing tinea unguium. German Collaborative Dermatophyte Drug Susceptibility Study Group. Antimicrob Agents Chemother 39: 1206-1208.

76. Korting HC and Schaller M (2001) Neue Entwicklungen in der medizinischen Mykologie. Hautarzt 52: 91-97.

77. Lappin-Scott HM, Rogers ME, Adlard MW, Holt G, and Noble WC (1985) High-performance liquid chromatographic identification of beta-lactam antibiotics produced by dermatophytes. J Appl Bacteriol 59: 437-441.

78. Lawry MA, Haneke E, Strobeck K, Martin S, Zimmer B, and Romano PS (2000) Methods for diagnosing onychomycosis: a comparative study and review of the literature. Arch Dermatol 136: 1112-1116.

79. Lay MJ and Wittwer CT (1997) Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. Clin Chem 43: 2262-2267.

80. Lilly KK, Koshnick RL, Grill JP, Khalil ZM, Nelson DB, and Warshaw EM (2006) Cost-effectiveness of diagnostic tests for toenail onychomycosis: a repeated-measure, single-blinded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests. J Am Acad Dermatol 55: 620-626.

81. Liu D, Coloe S, Baird R, and Pedersen J (2000) Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. J Med Microbiol 49: 493-497.

82. Liu D, Pearce L, Lilley G, Coloe S, Baird R, and Pedersen J (2002) PCR identification of dermatophyte fungi Trichophyton rubrum, T. soudanense and T. gourvilii. J Med Microbiol 51: 117-122.

83. Löffler J, Hagmeyer L, Hebart H, Henke N, Schumacher U, and Einsele H (2000) Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in Candida species. Clin Chem 46: 631-635.

84. Löffler J, Hebart H, Sepe S, Schumcher U, Klingebiel T, and Einsele H (1998) Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. Med Mycol 36: 275-279.

85. Lousbergh D, Buntinx F, and Pierard G (1999) Diagnosing dermatomycosis in general practice. Fam Pract 16: 611-615.

86. Luk JM, Kongmuang U, Tsang RS, and Lindberg AA (1997) An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the rfbS gene from serogroup D salmonellae: a rapid screening prototype. J Clin Microbiol 35: 714-718.

87. Machouart-Dubach M, Lacroix C, de Chauvin MF, Le G, I, Giudicelli C, Lorenzo F, and Derouin F (2001) Rapid discrimination among dermatophytes, Scytalidium spp.,

and other fungi with a PCR-restriction fragment length polymorphism ribotyping method. J Clin Microbiol 39: 685-690.

88. Male O (1981) Medizinische Mykologie. 1. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

89. Martin-Sanchez J, Pineda JA, Andreu-Lopez M, Delgado J, Macias J, De La RR, and Morillas-Marquez F (2002) The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum. Ann Trop Med Parasitol 96: 669-677.

90. Meinhof W (1990) Isolierung und Identifizierung von Dermatophyten. Zentralbl Bakteriol 273: 229-245.

91. Metzger-Boddien C and Kehle J (2005) Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA for detection of adenoviruses in feces. Intervirology 48: 297-300.

92. Millon L, Piarroux R, Deconinck E, Bulabois CE, Grenouillet F, Rohrlich P, Costa JM, and Bretagne S (2005) Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 43: 5097-5101.

93. Mochizuki T, Ishizaki H, Barton RC, Moore MK, Jackson CJ, Kelly SL, and Evans EG (2003) Restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA intergenic regions is useful for differentiating strains of Trichophyton mentagrophytes. J Clin Microbiol 41: 4583-4588.

94. Mochizuki T, Tanabe H, Kawasaki M, Ishizaki H, and Jackson CJ (2003) Rapid identification of Trichophyton tonsurans by PCR-RFLP analysis of ribosomal DNA regions. J Dermatol Sci 32: 25-32.

95. Monod M, Capoccia S, Lechenne B, Zaugg C, Holdom M, and Jousson O (2002) Secreted proteases from pathogenic fungi. Int J Med Microbiol 292: 405-419.

96. Morrison TB, Weis JJ, and Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. Biotechniques 24: 954-8, 960, 962.

97. Ohst T, De Hoog S, Presber W, Stavrakieva V, and Graser Y (2004) Origins of microsatellite diversity in the Trichophyton rubrum - T. violaceum clade (Dermatophytes). J Clin Microbiol 42: 4444-4448.

98. Okeke CN, Tsuboi R, Kawai M, Hiruma M, and Ogawa H (2001) Isolation of an intron-containing partial sequence of the gene encoding dermatophyte actin (ACT) and detection of a fragment of the transcript by reverse transcription-nested PCR as a means of assessing the viability of dermatophytes in skin scales. J Clin Microbiol 39: 101-106.

99. Oxford AE, Raistrick H, and Simonart P (1939) Studies in the biochemistry of micro-organisms: Griseofulvin, C(17)H(17)O(6)Cl, a metabolic product of Penicillium griseo-fulvum Dierckx. Biochem J 33: 240-248.

100. Panasiti V, Borroni RG, Devirgiliis V, Rossi M, Fabbrizio L, Masciangelo R, Bottoni U, and Calvieri S (2006) Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. Mycoses 49: 26-29.

101. Piérard GE, Arrese JE, Pierre S, Bertrand C, Corcuff P, Lévêque JL, and Piérard-Franchimont C (1994) Diagnostique microscopique dès onychomycoses. Ann Dermatol Venereol 121: 25-29.

102. Poljak M and Seme K (1996) Rapid detection and typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. J Virol Methods 56: 231-238.

103. Pryce TM, Palladino S, Kay ID, and Coombs GW (2003) Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. Med Mycol 41: 369-381.

104. Rieth H (1967) D-H-S-Diagnostik. Fortsch Med 85: 594.

105. Rippon JW (1988) Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. 3. Auflage. Philadelphia: WB Saunders.

106. Ririe KM, Rasmussen RP, and Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem 245: 154-160.

107. Roche Diagnostics GmbH (2000) General Recommendations for LightCycler Analysis of Multiple Mutations Using Hybridization Probe Color and Melting Temperature. Mannheim; Roche Applied Science Technical Note No. LC 14/2000.

108. Roche Diagnostics GmbH (2004) Developing Multicolor Applications for the LightCycler 2.0 System. Mannheim; Roche Applied Science Technical Note No. LC 20/2004.

109. Roche Diagnostics GmbH. www.roche.cl/diagnostics/applied_science3.htm . 2007.

110. Roth A, Mauch H, and Göbel UB (2001) Nukleinsäure-Amplifikationstechniken. In: Mauch H and Lütticken R, editors, MiQ: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. München, Jena: Urban & Fischer, 1-54.

111. Roth A, Mauch H, and Göbel UB (2001) Nukleinsäure-Amplifikationstechniken. In: MiQ: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. München; Jena: Urban und Fischer Verlag.

112. Roujeau JC, Sigurgeirsson B, Korting HC, Kerl H, and Paul C (2004) Chronic dermatomycoses of the foot as risk factors for acute bacterial cellulitis of the leg: a case-control study. Dermatology 209: 301-307.

113. Rozen S and Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol 132: 365-386.

114. Rycroft AN and McLay C (1991) Disinfectants in the control of small animal ringworm due to Microsporum canis. Vet Rec 129: 239-241.

115. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, and Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

116. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

117. Schaufuss P and Steller U (2003) Haemolytic activities of Trichophyton species. Med Mycol 41: 511-516.

118. Scott DA, Coulter WA, Biagioni PA, O'Neill HO, and Lamey PJ (1997) Detection of herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity by polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay at the prodromal stage of recrudescent herpes labialis. J Oral Pathol Med 26: 305-309.

119. Scotter JM, Campbell P, Anderson TP, Murdoch DR, Chambers ST, and Patton WN (2005) Comparison of PCR-ELISA and galactomannan detection for the diagnosis of invasive aspergillosis. Pathology 37: 246-253.

120. Seebacher C (2003) Zur Veränderung des Dermatophytenspektrums bei dermatologisch relevanten Erkrankungen. Mycoses 46 Suppl 1: 42-46.

121. Seebacher C (2005) Tinea der freien Haut. In: Korting HC, Callies R, Reusch M, Schlaeger M, and Sterry W, editors, Dermatologische Qualitätssicherung - Leitlinien und Empfehlungen. Berlin: ABW, 117-123.

122. Siebert PD and Larrick JW (1992) Competitive PCR. Nature 359: 557-558.

123. Sigurgeirsson B (2001) Prognostic factors for the treatment of onychomycosis in the long term. J Eur Acad Dermatol Venereol 15 (Suppl. 2): 98.

124. Speers DJ (2006) Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. Clin Biochem Rev 27: 39-51.

125. Tan BH, Lim EA, Liaw JC, Seah SG, and Yap EP (2004) Diagnostic value of real-time capillary thermal cycler in virus detection. Expert Rev Mol Diagn 4: 219-230.

126. Tang YW, Rys PN, Rutledge BJ, Mitchell PS, Smith TF, and Persing DH (1998) Comparative evaluation of colorimetric microtiter plate systems for detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 36: 2714-2717.

127. Tib Molbiol. LightCycler: Design. https://www.tib-molbiol.com/de/lightcycler/design/quantification.html . 2005.

128. Tietz H and Sterry W (2004) Antimykotika von A-Z. 3. Auflage. Stuttgart, New York: Thieme.

129. Tietz HJ, Czaika V, Ulbricht HM, and Sterry W (1999) Tinea capitis in Germany. A survey in 1998. Mycoses 42 Suppl 2: 73-76.

130. Tietz HJ, Hopp M, and Gräser Y (2002) First isolation of Trichophyton raubitschekii (syn. T. rubrum) in Europe. Mycoses 45: 10-14.

131. Tsuboi R, Okeke CN, Inoue A, Yamazaki M, Hiruma M, and Ogawa H (2002) [Identification and viability assessment of dermatophytes infecting nail based on

quantitative PCR of dermatophyte actin (ACT) mRNA]. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 43: 91-93.

132. Turin L, Riva F, Galbiati G, and Cainelli T (2000) Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. Eur J Clin Invest 30: 511-518.

133. Waters SM, Doyle S, Murphy RA, and Power RF (2005) Development of solution phase hybridisation PCR-ELISA for the detection and quantification of Enterococcus faecalis and Pediococcus pentosaceus in Nurmi-type cultures. J Microbiol Methods 63: 264-275.

134. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, and Najarian L (2003) Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. J Am Acad Dermatol 49: 193-197.

135. Weitzman I and Summerbell RC (1995) The dermatophytes. Clin Microbiol Rev 8: 240-259.

136. Welsh J and McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 18: 7213-7218.

137. Werse A (2006) 25 Jahre Applied Biosystems. Biospektrum 12: 401.

138. Wigger-Alberti W and Elsner P (1997) Fluoreszenz im Wood-Licht. Hautarzt 48: 523-527.

139. Wilhelm J (2003) Entwicklung Real-time-PCR-basierter Methoden für die moderne DNA-Analytik. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen.

140. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, and Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18: 6531-6535.

141. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, and Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques 22: 130-138.

142. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, and Balis UJ (1997) The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques 22: 176-181.

143. Youssef N, Wyborn CH, and Holt G (1978) Antibiotic production by dermatophyte fungi. J Gen Microbiol 105: 105-111.

144. Youssef N, Wyborn CH, Holt G, Noble WC, and Clayton YM (1979) Ecological effects of antibiotic production by dermatophyte fungi. J Hyg (Lond) 82: 301-307.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µ	mikro (10^{-6})
Å	Ångstrom, $1x10^{-10}$ m
A.	*Arthroderma*
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonsäure
AK	Antikörper
AP-PCR	*arbitrarily primed PCR*
ATCC	*American Type Culture Collection*
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CBS	*Centraalbureau voor Schimmelcultures*
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddH_2O	Bidestilliertes Wasser
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E.	*Epidermophyton*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
f	femto (10^{-15})
FL	Fluoreszein
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
G	Guanin
GOÄ	Gebührenordnung für Ärzte
h	Stunde(n)
Hae	*Haemophilus ducreyi*

HCl	Salzsäure
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
LC	LightCycler
m	milli (10^{-3})
M	molar
M.	*Microsporum*
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (*messenger RNA*)
l	Liter
NaOH	Natriumhydroxid
NTC	Negativkontrolle (*no template control*)
n	nano (10^{-9})
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
pH	potentia Hydrogenii, Maß für die Wasserstoffionenkonzentration
p	pico (10^{-12}) oder p-Wert, Irrtumswahrscheinlichkeit
POD	Peroxidase
Primer D, U	Primer Downstream, Upstream
RAPD	zufällig vervielfältigte polymorphe DNA (*randomly amplified polymorphic DNA*)
RFLP	*restriction fragment length polymorphism*
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*)
RT-PCR	Real-time PCR
s	Sekunde(n)
T	Thymin
T.	*Trichophyton*
T_m	Schmelztemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	*Thermus aquaticus*
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
TMB	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Aktivitätseinheit für Enzyme (*unit(s)*)

8. DANKSAGUNG

Vielen Dank

- Herrn Prof. Dr. med. G. Plewig und Herrn Prof. Dr. med. T. Ruzicka für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zu promovieren.
- Herrn Prof. Dr. med. H. C. Korting für die Überlassung und Betreuung des Dissertationsthemas, die konstruktive Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die allzeit offene Tür bei auftretenden Fragen und Problemen in herzlicher Weise.
- Herrn PD Dr. med. G. Bezold und seiner Frau Dr. med. P. Gottlöber für das unbeschreiblich große persönliche Engagement in allen PCR-Notlagen, die liebe Aufnahme in Neu-Ulm und Weißenhorn und die unendliche Geduld am Telefon auch während des Praxisbetriebs. Ohne Sie wäre diese Promotion nicht zustande gekommen!
- dem Tübinger Team, Herrn Prof. Dr. med. M. Schaller, Frau S. Schmidt und B. Walker für die Teilnahme und Unterstützung an der oligozentrischen Studie, die Begeisterung für molekulargenetische Dermatophytendiagnostik und die freundliche Aufnahme in Tübingen.
- Frau K. Fanderl, Frau A. Kerschnitzki und Herrn I. Anic für die engagierte und unkomplizierte Hilfe in allen mykologischen Fragestellungen, die unvergleichliche technische, moralische und leibliche Unterstützung und für einen wunderbaren, menschlichen Anlaufpunkt in der Klinik.
- Frau A. Kieslinger und Frau J. Laude für vielerlei technischen Rat.
- Meinen lieben Mitdoktoranden:

  Elisabeth Ruge für eine außergewöhnlich tiefe Freundschaft, für wunderschöne gemeinsame Stunden und Abende, für die gegenseitige Motivation und Hoffnung und den liebenswerten pharmazeutischen Austausch in allen Lebenslagen.

  Georg Schulz für eine unvergessliche Zeit im Candida-Labor im Wettstreit um den Nobelpreis, für durchlittene und durchwachte Tage im Januar 2005, fürs Korrekturlesen und das schöne Gefühl einer echten Freundschaft.

Astrid Scherzberg-Doktorczyk für ihre unkonventionelle Lebensart und psychologische Unterstützung in Krisenzeiten.

Günther Weindl für unvergleichliches Wissen und Beistand auf wissenschaftlicher Ebene sowie Alex Roeder für die Wegbereitung der Promotion und die persönliche Einführung in die Arbeitsgruppe.

- den „Kellerforschern“ der Allergieabteilung Frau S. Maier und Herrn Dr. hum. biol. B. Summer für die nimmermüde Hilfe, den fruchtbaren Austausch und die liebe nachbarschaftliche Gesellschaft auch über den Keller hinaus.

Mein tiefster Dank gilt aber meinen Eltern,
die mich unendlich unterstützt und gefördert haben.
Danke für alles!

9. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name	Barbara Silvia Elsbeth Beifuß
Geburtsdatum	11.02.1979
Geburtsort	München
Eltern	Dipl.-Ing. Wolfgang Beifuß, Elektroingenieur
	Rita Beifuß, geb. Zillner, Kinderkrankenschwester

Ausbildungsdaten

1985 - 1989	Grundschulen Vilshofen, Traunreut, Chieming
1989 - 1998	Chiemgau-Gymnasium Traunstein Abschluss: Allgemeine Hochschulreife Note: 1,2
11/1998 - 10/2002	Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg
08/2000	Erstes Staatsexamen
09/2002	Zweites Staatsexamen
11/2002 - 10/2003	Praktisches Jahr: Apotheke des Klinikums der Universität Regensburg Pauersche Apotheke Traunstein
11/2003	Drittes Staatsexamen
12/2003	Erteilung der Approbation als Apothekerin Gesamtnote: 1,78
01/2004	Beginn der Doktorarbeit

Publikationen

Beifuß B, Borelli C, Korting HC (2006) Mykologisches Labor. Hautarzt 57: 487-492.

Beifuß B (2007) Sofortdiagnostik mittels PCR-ELISA-Methode in München entwickelt. Mykologie Forum 01/2007: 23-24.

Poster- und Tagungsbeiträge

Beifuß B, Bezold G, Korting HC (2006) Direct detection of five common dermatophytes in clinical samples using a rapid and sensitive PCR-ELISA technique. Mycoses 49: 382.

Beifuß B, Bezold G, Korting HC (2006) Etablierung einer molekularen Sofortdiagnostik von fünf gängigen Dermatophyten-Spezies aus nativem Patientenmaterial mittels einer sensitiven PCR-ELISA-Methode innerhalb von 24 Stunden. *40. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Medizinische Mykologie*, Innsbruck, 7.-9.9.2006.

Beifuß B, Korting HC (2006) Molekulare Sofortdiagnostik bei Tinea. *Wissenschaftstag an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität*, München, 18.11.2006.