

# Entwicklung eines PCR-ELISA Verfahrens für die Diagnostik von Dermatophyten



Projektleiter: Dipl.-Ing. Sc. Natalie Rangno  
 Bearbeiter: Dipl.-Ing. Sc. Natalie Rangno, Petra Langensiepen  
 Förderinstitution: BMWi / EuroNorm / INNO-KOM  
 Kooperationspartner: Prof. Dr. Pietro Nenoff  
 (Labor für medizinische Mikrobiologie Mölbis)

## Einleitung

Dermatophyten (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. und *Epidermophyton* spp.) besitzen die Fähigkeit, die keratinisierten Gewebe (Haut, Haare und Nägel) von Menschen und Tieren anzugreifen und dort Infektionen hervorzurufen. Es wird geschätzt, dass ca. 2 % bis 3 % der weltweiten Bevölkerung an einer Nagelpilzkrankung leiden. Der häufigste Fußpilzreger ist *T. rubrum*, der in etwa 78 % der Dermatophytenisolate gefunden wird. Danach folgen *T. interdigitale* (früher *mentagrophytes*) mit ca. 20 % und vereinzelt auch *E. floccosum* sowie *M. canis* (Uhrlaß et al. 2012).

Eine optimale und differenzierte Therapie der Dermatophyten-Infektion erfordert vorab eine schnelle und sichere Diagnose des Pilzregers und die anschließende Differenzierung. Das Spektrum der Diagnosemethoden reicht hierbei vom Nativpräparat über die zeitaufwändige Pilzkultur und spezielle Diagnostik-Methoden bis hin zu molekulargenetischen Techniken. Oft ist die Diagnose aufgrund höherer Kosten und des hohen technischen Aufwandes erst nach 2 bis 4 Wochen möglich.

## Zielstellung

Deshalb initiierte das Mykolabor im IHD die Entwicklung eines molekularbiologischen Nachweisystems für klinisch relevante Dermatophyten auf Basis des PCR-ELISA (Polymerase Chain Reaction-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Verfahrens. Die besondere Herausforderung des Forschungsvorhabens bestand in der Beschaffung und Analyse von 30 Dermatophytenpezies, in der Ermittlung effektiver DNA-Extraktionsverfahren, der Identifizierung geeigneter Referenzsequenzen und der Generierung von Sonden für die verschiedenen Dermatophytenpezies sowie der Entwicklung und Optimierung des PCR-ELISA Verfahrens durch eine umfangreiche Validierung an Praxisproben.

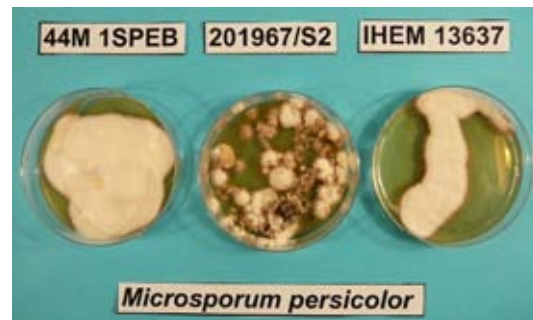


Abb. 1: Drei verschiedene Stämme von *Microsporum persicolor* auf Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA)

## Untersuchungen und Ergebnisse

### DNA-Extraktion

Zur Ermittlung effektiver DNA-Extraktionsverfahren aus Dermatophyten wurden sieben handelsübliche Kits sowie eine CTAB-Methode an reinem Pilzmaterial von *E. floccosum*, *M. canis* und *T. rubrum* getestet. Ziel war es, eine Maximierung der DNA-Ausbeute bei gleichzeitig hoher Qualität (geringe Degradation und sichere PCR-Amplifikation) zu erreichen.

Als Ergebnis wurde ein Protokoll auf Basis des MasterPure™ Yeast DNA Purification Kits (EPICENTRE® Biotechnologies, Biozym GmbH) zur DNA-Extraktion aus Reinkulturen entwickelt und an mehreren Praxisproben, wie z.B. Nägel und Hautschuppen, erfolgreich getestet. Zudem wurden die Versuche zur DNA-Extraktion an reinem Dermatophytenmaterial unter Einsatz von drei automatischen Extraktionssystemen (InnuPure® C16, Analytik Jena AG; KingFisher Duo, Fisher Scientific GmbH und Qiacube, Qiagen GmbH) durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die zur Zeit verfügbaren Kits für Pflanzen, Hefen und Bakterien sowie die zugehörigen Protokolle in Verbindung mit den entsprechenden automatischen Extraktionssystemen den Anforderungen der Dermatophyten-diagnostik noch nicht genügen (Rangno 2012).

### Referenzsequenzen

Für die notwendige eigene Erarbeitung von Referenzsequenzen wurden 136 Referenzstämme (3 bis 5 Stämme pro Pilzart, siehe Abb. 1) der 30 Dermatophytenarten und ca. 145 Praxisproben aus verschiedenen medizinischen Einrichtungen und Institutionen beschafft und konventionell und molekular diagnostisch untersucht.

Eine Spezies-Identifikation erfolgte über die Sequenzierung (Macrogen GmbH) von polymorphen Abschnitten des PCR-Amplifikats mit anschließendem Abgleich in Datenbanken. Dabei wurden komplette ITS (Internal Transcribed Spacers)-Bereiche der ribosomalen DNA sowie Beta-Tubulin-Gen (partiell) als DNA-Zielsequenzen benutzt. Auf Basis der Referenzsequenzen wurden Sequenzalignmente und phylogenetische Stammbäume erstellt und die DNA-Polymorphismen (SNP) innerhalb der Arten bzw. Gattungen ermittelt (Rangno, 2012).

### Sonden

Die ermittelten Referenzsequenzen wurden für die Ableitung art- und gattungsspezifischer Dermatophyten-Sonden bioinformatisch genutzt. Die ausgewählten Sonden wurden anschließend durch eine BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Recherche auf ihre Spezifität für die jeweilige Pilzart vergleichend mit allen Pilzsequenzen der NCBI-Datenbank analysiert sowie mit der PCR überprüft.

Es zeigte sich, dass die beiden ausgewählten DNA-Regionen keine ausreichende Sequenzvariabilität beinhalten, um die 30 Dermatophytenarten differenzieren zu können. So sind z. B. die Sequenzen innerhalb der Arten *M. audouinii*, *M. canis* und *M. ferrugineum* sowie *T. violaceum* und *T. rubrum* (früher auch *T. soudanese* und *T. raubitschekii*) zu homolog, um eine spezifische Sonde zu generieren. Diese Arten wurden bei dem Sonden-Design zu Clustern zusammengefasst. Bei anderen Arten, wie z. B. *T. terrestre* oder *T. thuringiense*, war die Anzahl der SNPs innerhalb einer Art jedoch unerwartet hoch.

Insgesamt wurden für die 17 Dermatophytenarten zwei bis vier spezifische Sonden und mehrere Cluster-Sonden generiert.

### PCR-ELISA

Die PCR-ELISA Methode wurde mit zwei kommerziell erhältlichen Kits (PCR ELISA Dig-Labeling und PCR ELISA, Dig Detection; Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. Das Prinzip hierbei war die Amplifikation mit universellen Primern, die in stark konservierten Bereichen die entsprechenden Gene binden. Das Amplifikat selbst beinhaltet Regionen, die wiederum zu den Spezies spezifisch und zu den generierten Sonden identisch sind. Der Nachweis der Bindung an die Sonden erfolgt immunologisch über ein sichtbares Substrat in einer Mikrotiterplatte

(Abb. 2). Die Intensität der resultierenden Färbung wird mit einem Photometer (Multiscan FC, Thermo Scientific GmbH) bei einer Absorption 405 nm und 492 nm bestimmt und ist ein Maß für die Spezifität der Sonden bzw. der Amplifikationseffizienz.

Zurzeit erfolgt die Sonden-Validierung mit der PCR-ELISA Methode an ausgewählten Dermatophyten und Praxisproben. Eine spezifische Sonde für *T. verrucosum* wurde bereits für die Routinediagnostik im Labor Mölbis bei der PCR-ELISA Methode eingesetzt.

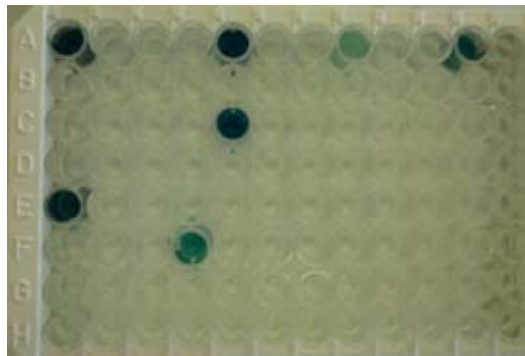


Abb. 2: Sonden-Test mit der PCR-ELISA Methode auf eine Mikrotiterplatte

### **Zusammenfassung und Ausblick**

Die PCR-ELISA Methode ist inzwischen eine anerkannte und übliche Technik in der Routinediagnostik der fünf häufigsten Dermatophyten im Labor Mölbis. Nachteile sind jedoch hoher Aufwand und begrenzte Verfügbarkeit der spezifischen Dermatophyten-Sonden. Mit den Forschungsergebnissen wurde die Anwendung des PCR-ELISA Verfahrens auf 12 bisher nicht erfasste Dermatophytenpezies erweitert. Zukünftig kann die aufwändige PCR-ELISA Methode durch andere Verfahren, wie z. B. DNA-Chip-Technologie und PCR-LFA (PCR Lateral Flow Assays) sowie RT-PCR (Real-Time PCR), ersetzt werden, die entwickelten spezifischen Dermatophyten-Sonden sind dafür universell einsetzbar. Weiterer Forschungsbedarf besteht in der Sequenzanalyse von weiteren polymorphen DNA-Regionen in Bezug auf die Systematik sowie die Dermatophyten-Diagnostik.

### **Literatur**

Uhrlaß S, Krüger C, Bezold G, Nenoff P (2012): The value of a molecular biological technique - polymerase chain reaction (PCR) - for direct detection of dermatophyte DNA in nail samples from patients with suspected fungal nail infection in routine laboratory diagnostics. Poster-Abstract, Mycoses 2012; 55, Suppl. 4: 336

Rangno N (2012): Entwicklung eines PCR-ELISA-Verfahrens für die Diagnostik von Dermatophyten. Poster zum Innovationstag Mittelstand des BMWi, Berlin, 09. 06. 2012