
BACHELORARBEIT

Frau
Gina-Marie Illigner

Antimykotika-resistente Dermatophyten in Bangladesch

Molekulare Identifizierung und Resistenztestung
mit Breakpoint-Methode und
Punktmutationsanalyse der Squalenepoxidase
des neuen Dermatophyten *Trichophyton
indotineae*

2023

BACHELORARBEIT

Antimykotika-resistente Dermatophyten in Bangladesch

**Molekulare Identifizierung und Resistenztestung
mit Breakpoint-Methode und
Punktmutationsanalyse der Squalenepoxidase
des neuen Dermatophyten *Trichophyton
indotineae***

Autorin:

Gina-Marie Illigner

Studiengang:

Bachelor Biotechnologie

Seminargruppe:

BT19wM-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:

Prof. Dr. med. Pietro Nenoff

Weiterer Betreuer:

Dipl. Ing. Sandra Feik

Silke Uhrlaß

Mittweida, 03. April 2023

Bibliografische Angaben

Illigner : Antimykotika-resistente Dermatophyten in Bangladesch , Molekulare Identifizierung und Resistenztestung mit Breakpoint-Methode und Punktmutationsanalyse der Squalenepoxidase des neuen Dermatophyten *Trichophyton indotineae*, 58 Seiten, 17 Abbildungen, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften

Englischer Titel: *Antimycotic-resistant dermatophytes in Bangladesh - molecular identification and resistance testing using breakpoint method and point mutation analysis of squalene epoxidase of the new dermatophyte Trichophyton indotineae*

Bachelorarbeit, 2023

Satz: L^AT_EX

Kurzbeschreibung

Weltweit sind oberflächliche Pilzinfektionen weit verbreitet. Diese äußern sich in Rötungen, Schuppungen und Juckreiz und sind belastend für jeden Betroffenen. In dieser Arbeit werden Pilzproben aus Bangladesch untersucht, um diese auf molekularer Ebene zu identifizieren. Dazu wurden Methoden, wie Kultivierung und Sequenzierung angewandt. Weiterhin wurden alle Kulturen auf Antimykotika getestet, um bei möglichen Resistenzen eine patientenspezifische Behandlung ermöglichen zu können. Darüber hinaus wurde ermittelt, durch welche genetischen Änderungen die Resistenzen verursacht werden. Dies erfolgte durch die Sequenzierung bestimmter Gene der Dermatophyten-DNA.

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Danksagung.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	2
1.2 <i>Trichophyton indotineae</i>	3
1.3 Arten von Dermatophyten-Erkrankungen.....	6
1.4 Behandlung von Dermatomykosen.....	8
1.4.1 Antimykotika.....	9
1.4.2 Anwendung der Antimykotika auf Dermatophyten-Erkrankungen.....	10
1.4.3 Resistenzentwicklung.....	14
1.5 Diagnostik.....	16
1.5.1 Breakpoint-Agardilution.....	16
1.5.2 Multiplex Real-Time PCR.....	17
2 Zielstellung.....	21
3 Material.....	22
3.1 Organismen.....	22
3.2 Kits und Materialien.....	23
3.3 Molekularbiologische Reagenzien.....	23
3.4 Geräte.....	24
3.5 Experimentelle Zusammensetzungen.....	25
4 Methoden.....	26
4.1 Kultivierung.....	26
4.2 Genotypisierung.....	26
4.3 Resistenztestung.....	27
4.4 Mutationsanalyse der Squalenepoxidase.....	28

4.5	Mutationsanalyse durch PCR	29
4.6	Epsilometer-Test	30
4.7	Mutationsanalyse des <i>Erg11B</i> -Gens	30
4.7.1	Primer-Design.....	30
4.7.2	Sequenzierung	30
5	Ergebnisse	32
5.1	Genotypisierung	32
5.2	Resistenztestung	33
5.3	Epsilometer-Test	35
5.4	Mutationsanalyse der Squalenepoxidase.....	37
5.5	Mutationsanalyse durch PCR	39
5.6	Sequenzierung des <i>Erg11B</i> -Gens	42
6	Diskussion.....	46
6.1	Erregerbestimmung.....	46
6.2	Resistenztestung	46
6.3	Terbinafin-Resistenz durch Mutationen der Squalenepoxidase	47
6.4	Itraconazol-Resistenz durch Mutationen des <i>ERG11</i> -Gens	49
7	Ausblick.....	51
8	Zusammenfassung	52
	Literatur	54

II. Abbildungsverzeichnis

1.1	Mikroskopische Aufnahme von <i>T. rubrum</i> (Klonowski und Nenoff, o.A.[b]) Akladiumförmig angeordnete piriforme Mikrokonidien	2
1.2	Mikroskopische Aufnahmen von <i>T. indotineae</i> a: zahlreiche runde Mikrokonidien und Chlamydosporen, b: Spiralhyphen und Mikrokonidien, c: Pilzmyzel, d: Zigarrenförmige, fast spindelartig geformte Makrokonidie	5
1.3	Scheamtische Darstellung der qPCR mit Denaturierung, Sonden- und Primer-Annealing und Elongation (verändert nach Hawkins und Guest (2017)).....	18
1.4	Ermittlung des C_T -Wertes einer Probe (Konrad und Busch, 2010)	18
4.1	PCR Programm der Sequenzierung der <i>ITS</i> -Region (nach dem my-Budget 5x Mastermix Protokoll) 1 Initiale Denaturierung, 2 Denaturierung, Annealing und Elongation, 3 Finale Elongation	26
4.2	PCR Programm der Sequenzierung des <i>SQLF</i> -Gens (nach dem Biozym 2x Red HS Taq Master Mix Protokoll) 1 initiale Denaturierung, 2 Denaturierung, Annealing und Elongation, 3 finale Elongation	29
4.3	PCR Programm der Sequenzierung des <i>Erg11B</i> -Gens (nach dem Biozym 2x Red HS Taq Master Mix Protokoll) 1 initiale Denaturierung, 2 Denaturierung, Annealing und Elongation, 3 finale Elongation.....	31
5.1	Ausschnitt des Multiplen Sequenz-Alignment der 79 Sequenzen (Erstellt mit MEGAX)	32
5.2	Probe Nr. 47 Links: Testung auf Terbinafin mit dem Ergebnis „resistent“, rechts: Testung auf Itraconazol mit dem Ergebnis „resistent“.....	34
5.3	Probe Nr. 59 Links: Testung auf Terbinafin mit dem Ergebnis „resistent“, rechts: Testung auf Itraconazol mit dem Ergebnis „sensibel“	34
5.4	Probe Nr. 77 Links: Testung auf Terbinafin mit dem Ergebnis „sensibel“, rechts: Testung auf Itraconazol mit dem Ergebnis „sensibel“	35
5.5	Vorder- und Rückseite der E-Test-Kultur der Probe Nummer 14 Resistenz bis 0,5 mg/l	36
5.6	Vorder- und Rückseite der E-Test-Kultur der Probe Nummer 57 Resistenz bis 0,75 mg/l.....	36
5.7	Vorder- und Rückseite der E-Test-Kultur der Probe Nummer 84 Resistenz über 32 mg/l	36

5.8	Ausschnitte des Multiplen Sequenzalignments zur Identifizierung von Mutationen im <i>SQLE</i> -Gen an den Protein-Positionen 393, 397, 429, 436 und 448 (Erstellt mit MEGAX und bearbeitet mit Paint).....	37
5.9	Schmelzkurvenwerte durch die multiplex Real-Time PCR Verdeutlichung der Auswertung der Erregeridentifikation	40
5.10	Ausschnitt des Multiplen Sequenzalignments zur Identifizierung von Mutationen im <i>Erg11B</i> -Gen an den Protein-Positionen 441, 443, 444 und 445 (Erstellt mit MEGAX und bearbeitet mit Paint)	42

III. Tabellenverzeichnis

1.1	Überblick über die durch Dermatophyten ausgelösten Erkrankungen und der befallenen Regionen (Mayser et al., 2020)	6
1.2	In Deutschland zugelassene Azol-Antimykotika in der Humanmedizin (2001) (BgVV, 2001)	9
1.3	Therapie einer Onychomykose (Wollina et al., 2016) Die Therapiedauer beträgt in der Regel 6 Wochen bei Fingernagelbefall und 12 Wochen bei Zehnnagelbefall	11
1.4	Topische Antimykotika mit dem jeweiligen antimikrobiellen Spektrum (Nenoff, Krüger, Paasch et al., 2015) D: Dermatophyten, H: Hefepilze, S: Schimmelpilze	13
1.5	Systemische Therapie der Tinea capitis mit Ausnahme von Infektionen, die durch <i>M. canis</i> bedingt sind (Seebacher und Abeck (2003) und Nenoff, Krüger, Paasch et al. (2015)).....	14
3.5	Reaktionsansatz durch PCR der <i>ITS</i> -Region der Dermatophyten.....	25
3.6	Reaktionsansatz durch PCR des <i>SQLE</i> -Gens.....	25
3.7	Reaktionsansatz durch PCR des <i>Erg11B</i> -Gens	25
4.1	Mischprotokoll für die 1:10 Verdünnungen von Terbinafin und Itraconazol	27
4.2	Mischprotokoll für die 1:10 und 1:1 Verdünnungen von Terbinafin	28
5.1	Vergleich der Ergebnisse der Genotypisierung durch Sequenzierung und durch Kultivierung	32
5.2	Ergebnisse der Resistenztestung auf Terbinafin und Itraconazol	33
5.3	Differenzierung zwischen resistenten, sensiblen und gehemmten Stämmen in Bezug auf Terbinafin und Itraconazol	33
5.4	Zusammenhang zwischen der Terbinafin und Itraconazol-Resistenz	34
5.5	Ergebnisse des Epsilometer-Test von 22 untersuchten Proben im Vergleich zu dem Breakpoint-Test bei 0,5 μ l/ml +++: starkes Wachstum, ++: deutlich sichtbares Wachstum, +: leichtes Wachstum, (+): schwaches Wachstum	35
5.6	Ergebnisse der Mutationsanalyse durch Sequenzierung.....	37
5.7	Zusammenfassung der Mutationen bezogen auf die Gesamtanzahl der Isolate	38

5.8 Zusammenhang zwischen der Terbinafin- und Itraconazol-Resistenz und Punktmutationen	38
5.9 Ergebnisse der Resistenztestung mittels DermaGenius Resistance Kit	40
5.10 Zusammenhängende Darstellung der PCR-, Sequenzierungs- und Kulturergebnisse der Resistenz- und Mutationsanalyse	40
5.11 Ergebnisse der Mutationsanalyse durch Sequenzierung des <i>Erg11B</i> -Gens bezogen auf Isolate mit Mutationen	43
5.12 Zusammenhang zwischen Punktmutationen des <i>Erg11B</i> -Gens mit der Resistenz gegenüber Itraconazol bezogen auf alle untersuchten Proben	43
5.13 Zusammenfassung der Zusammenhänge zwischen Resistenz und Mutationen des <i>Erg11B</i> -Gens bezogen auf alle untersuchten Proben	44
5.14 Vergleich der Mutationen des <i>Erg11B</i> -Gens mit der Ala ⁴⁴⁸ Tyr Mutation des <i>SQLE</i> -Gens bezogen auf alle untersuchten Proben	45

IV. Abkürzungsverzeichnis

(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	desoxyNukleosidtriphosphat
DSMO	Dimethylsulfoxid R
E-Test	Epsilometer-Test
E.	<i>Epidermophyton</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Erg11	Lanosterol 14-Alpha-Demethylase
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
fwd	vorwärts (engl. <i>forward</i>)
ITS	Internal Transcribed Spacer
M.	<i>Microsporum</i>
MEGAX	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHK	Minimale Hemmkonzentration (engl. <i>MIC, Minimum Inhibitory Concentration</i>)
OTC	rezeptfrei (engl. <i>over-the-counter</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
qPCR	quantitative (Real-Time) PCR
rDNA	ribosomale DNA
rev	rückwärts (engl. <i>reverse</i>)
s.	siehe
SQLE	Squalen-Exposidase
T.	<i>Trichophyton</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid

V. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zu der Anfertigung dieser Bachelorarbeit beigetragen haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Pietro Nenoff und Frau Silke Uhrlaß, die meine Bachelorarbeit betreut und begutachtet haben. Für die hilfreichen Worte bei allen Fragen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Ich bedanke mich bei Frau Sandra Feik für die Betreuung dieser Bachelorarbeit und die gute Zusammenarbeit.

Auch bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Labor für medizinische Mikrobiologie in Mölbis für die aufbauenden Worte.

Ein großes Dankeschön geht an meine Eltern, die mich sowohl während des Studiums als auch während des Prozesses dieser Bachelorarbeit immer unterstützt und motiviert haben. Außerdem bedanke ich mich bei meinem Freund, meinem Bruder, meinen Freunden und allen Familienangehörigen, die stets ein offenes Ohr und aufbauende Worte für mich hatten.

1 Einleitung

Oberflächliche Pilzinfektionen der Haut sind häufig und weltweit verbreitet. Der Pilzbefall der Haut äußert sich meist in Form von ekzematischen Veränderungen, wie Rötungen, Schuppung und Juckreiz, die sich, je nach Körperregion, unterschiedlich darstellen können und mitunter klinisch nicht von Ekzemen anderer Ursachen unterscheidbar sind (Heller-Vitouch, o. D.). Pilzkrankungen werden als Dermatomykosen bezeichnet. Dabei haben bestimmte Personengruppen ein besonders hohes Infektionsrisiko für bestimmte Mykosen, wie z.B. Bergarbeiter und Sportler für *Tinea pedis*. Etwa 25 % der Bevölkerung in Industriestaaten leiden an einer *Tinea pedis*, welche damit zu den häufigsten Infektionen zählt. Die Prävalenz einer Nagelpilzinfektion (Onychomykose) in Deutschland beträgt 12,4 % (Dr. Walliczek-Dworschak, 2019). Etwa drei bis fünf Prozent der Gesamtbevölkerung leiden unter einer Nagelpilzkrankung, im höheren Alter sind es mehr als 50 %. Der Anteil aller Pilzinfektionen an allen Nagelpilzkrankungen beträgt etwa 30 %. Häufig wird die Erkrankung bagatellisiert, obwohl sie beträchtliche gesundheitsökonomische Auswirkungen hat und für die Betroffenen meist sehr belastend ist. Zahlreiche Studien wiesen auf den teils beträchtlichen Leidensdruck der Patienten bezüglich psychischem, mentalem und sozialem Wohlbefinden sowie ihrer gesellschaftlichen Stigmatisierung hin. Die antimykotische Therapie reduzierte all diese Aspekte auf etwa 40 % der Ausgangsbasis. Vor dem Beginn dieser Therapie sollte jedoch unbedingt der Befund einer Pilzinfektion sichergestellt werden. Methodisch stehen unter anderem die mikroskopische Beurteilung von abgeschabtem Haut- bzw. Nagelmaterial und die Pilzkultur zur Verfügung. Für eine systemische Behandlung ist neben dem Pilznachweis auch eine Identifikation des Erregers erforderlich (Heller-Vitouch, o. D.).

Dermatophyten gehören demnach zu der Herrschaft der Pilze. Diese zählen zu den eukaryotischen Lebewesen (Miksits und Hahn, 1999). Die Reproduktionsorgane, oder Fruktifikationsorgane genannt, werden in Sporen für die sexuelle Vermehrung und in Konidien oder Sporangien für die asexuelle Vermehrung unterteilt. Bei Konidien wird zusätzlich in einzellig (Mikrokonidien) und mehrzellig (Makrokonidien) unterschieden. Im medizinischen Bereich werden Pilze auch in Sproßpilze (Blastomyzeten), Fadenpilze (Hyphomyzeten), wie Dermatophyten und Schimmelpilze, und dimorphe Pilze klassifiziert. Dimorphe Pilze liegen dabei bei 37°C im Körper oder auf Kulturmedien als Sproßpilze und bei Zimmertemperatur oder in freier Natur als Fadenpilze vor. Als Fadenpilze bilden sie außerdem infektiöse Sporen aus (Miksits und Hahn, 1999).

Dermatomykosen werden in den häufigsten Fällen durch Dermatophyten ausgelöst (Neff, Krüger, Tietz et al., 2014). Dabei ist der anthorpophile Dermatophyt *Trichophyton (T.) rubrum* der weltweit häufigste Erreger. Sie verursachen Pilzinfektionen der Haut, Haare und Nägel (Kolb-Mäurer und Kurzai, 2020). Außerdem sind sie weltweit verbreitet und gehören mit einem Anteil von 10-20 % der Erkrankten an der Gesamtbevölkerung zu den häufigsten Infektionskrankheiten (Höck, 2012).

Dermatophyten gehören zu der ältesten Gruppe der Mikroorganismen, welche als Ver-

ursacher menschlicher Krankheiten bekannt sind. Die Beschreibung der Taxonomie begann bereits im Jahr 1841. Seitdem wurde diese den neusten Erkenntnissen angepasst. Laut Hoog et al. (2017) können Dermatophyten in sieben Kladen (Gattungen) unterteilt werden: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Microsporum* und *Arthroderma*. Für diese Arbeit ist allerdings die Gattung *Trichophyton* relevant. Diese Stämme sind durch üppige Mikrokonidienbildung und glattwandige Makrokonidien gekennzeichnet. Die Gattung besteht aus vielen Arten, welche Haut, Nägel und Haare befallen können. Am häufigsten tritt *T. rubrum* auf. Dieser Erreger befällt die Haut und Nägel, selten auch Haare. Vermutlich wurde er über den Sklavenhandel von Afrika über Amerika nach Europa verschleppt (Schiessl et al., 2021).

1.1 *Trichophyton rubrum*

Der weltweit häufigste Dermatophyt mit der höchsten Inzidenz in Europa ist *Trichophyton rubrum*. Dabei handelt es sich um einen mikroskopisch kleinen Fadenpilz. Der Name „Trichophyton“ leitet sich aus dem Griechischen von „ $\Theta\rho\iota\chi\omicron\varsigma$ “ für „Haar“ und „ $\phi\upsilon\tau\omicron\nu$ “ für „Pflanze“ ab. „Rubrum“, lateinisch für rot, gibt einen Hinweis auf die in der Pilzkultur erkennbare rotbraune Pigmentbildung an der Kolonienunterseite des weißen Thallus. Gegensätzlich zu den meisten Dermatophyten befällt *T. rubrum* nur im Ausnahmefall Haare und Haarwurzeln. Die Zielstrukturen sind hier eher das Stratum corneum der Epidermis und das Nagelkeratin (Nenoff, Krüger, Tietz et al., 2014).

Bereits nach fünf bis sieben Kulturtagen bildet *T. rubrum* ein weißes, flaumiges Luftmyzel aus. Ausgehend von einem zentralen Köpfchen bilden sich Radiärfalten, welche in einem flachen, breiten Kolonienrand einmünden. Gelegentlich ist die flache Peripherie, abhängig vom Nährboden, diskret olivgrün tingiert, in einigen Fällen auch leicht orange oder violett gefärbt. Auf Sabouraud-Glucose-Agar ist die Kulturunterseite braun-rot pigmentiert, wobei der Farbstoff nicht oder nur wenig in den Nährboden abgegeben wird. Das Wachstum von *T. rubrum* ist dabei abhängig von dem für die Kultivierung verwendeten Nährboden. Auf Dermatophyten-Selektivagar, welcher Cycloheximid bzw. Actidion enthält, kann die rotbraune Pigmentierung auf der Kolonienunterseite fehlen (Nenoff, Krüger, Tietz et al., 2014).

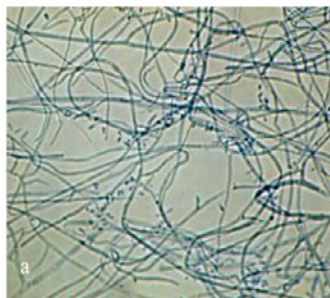


Abbildung 1.1: Mikroskopische Aufnahme von *T. rubrum* (Klonowski und Nenoff, o.A.[b])
Akladium-förmig angeordnete piriforme Mikrokonidien

In Abbildung 1.1 sind die spärlich ausgebildeten Mikrokonidien gezeigt. Diese sind länglich, piriform (birnenförmig) und in Akladium-Form (kornährenartig) an den sehr dünnen, septierten und hyalinen Hyphen angeordnet (Nenoff, Krüger, Tietz et al., 2014).

Mit 91 % trägt *T. rubrum* den größten Anteil der bei einer Onychomykose isolierten Dermatophyten (Wollina et al., 2016). Darüber hinaus ist dieser Pilz für Tinea pedis (Fußpilz), seltener auch Tinea corporis (Körper), Tinea manuum (Hand) und Tinea cruris (Unterschenkel) verantwortlich. Allerdings muss heute auch mit *T. rubrum*-Infektionen an anderen, früher als ungewöhnlich angesehenen Körperregionen gerechnet werden. Dabei kann eine Tinea faciei (Gesicht) oder Tinea barbae (Bart) infolge einer Autoinokulation, einer Verschleppung von Krankheitserregern, von einer Tinea pedis et unguium der unteren Extremitäten sein. Ebenfalls außergewöhnlich ist eine Tinea capitis (Nenoff, Krüger, Schaller et al., 2014).

Zur Behandlung dieser Mykosen ist eine Vielzahl von antimykotischen Substanzen mit starker Wirkung gegen Dermatophyten verfügbar, welche in Kapitel 1.4 genauer beschrieben werden. Darunter befinden sich Breitspektrum-Antimykotika mit Aktivität gegen Dermatophyten, Hefe- und Schimmelpilze. Neben Imidazolen bieten sich zur topischen Therapie der Tinea pedis u.a. das Hydroxypyridon Ciclopiroxolamin, das Allylamin Terbinafin, das Morpholin Amorolfiin und Thiocarbamate an. Demgegenüber wirkt das Polyen-Antimykotikum Nystatin nicht gegen Dermatophyten, sondern ausschließlich gegen Hefepilze. Es sollte demzufolge bei Tinea pedis nicht eingesetzt werden, dagegen bei intertriginöser Candidose. Bei durch *T. rubrum* ausgelösten Onychomykosen wird als adjuvante Maßnahme vor der lokalen und systemischen antimykotischen Behandlung die „atraumatische Nagelextraktion“ empfohlen. Diese erreicht man durch Keratolyse mit hochprozentigen (20-40 %) Harnstoff-Zubereitungen unter Okklusion. Leichte oder mäßig ausgeprägte Infektionen der Nägel können mit topischen Antimykotika in Nagellackform behandelt werden. Verfügbar sind die Wirkstoffe Ciclopiroxolamin (tägliche Anwendung) und Amorolfiin (einmal wöchentliche Anwendung) in alkoholischen Lackformulierungen. Zur Therapie der Onychomykose zugelassen sind Terbinafin, Itraconazol und Fluconazol (Klonowski und Nenoff, o.A.[b]).

1.2 *Trichophyton indotineae*

Ein weiterer, sich zunehmend verbreitender Dermatophyt ist *Trichophyton indotineae*, welcher vor seiner Neubenennung *T. mentagrophytes* Genotyp VIII genannt wurde. Die beiden *Trichophyton*-Arten *T. mentagrophytes* und *T. interdigitale* können mikroskopisch nicht voneinander unterschieden werden. Jedoch können einige Stämme der früheren *T. mentagrophytes variatio interdigitale* mit weißen, flauschigen Kolonien von *T. mentagrophytes* und *T. interdigitale* Stämmen unterschieden werden, welche eine körnigere Thallusoberfläche der Kolonien aufweisen. *T. mentagrophytes* Genotyp VIII ist einer von mehr als zehn bekannten und neu beschriebenen Genotypen oder Clustern innerhalb des *T. mentagrophytes/T. interdigitale*-Komplexes. Derzeit sind zwei Genotypen (Genotyp I und Genotyp II) innerhalb der anthropophilen Spezies *T. interdigitale* und 11

Genotypen der zoophilen Spezies *T. mentagrophytes* bekannt, einschließlich des *ITS*-Genotyp VIII. Paradox ist jedoch, dass die letztgenannte Art nach der derzeitigen Klassifizierung zwar als zoophil eingestuft wird, aber überwiegend von Mensch zu Mensch übertragen wird, weshalb er wiederum als anthropophil eingestuft werden müsste (Nenoff, Uhrlaß et al., 2022).

Der Name *T. mentagrophytes* Genotyp VIII wurde 2020 in *T. indotineae* geändert (Kano et al., 2020). Hergeleitet wurde dieser Name durch die Ausbreitung des Stammes ausgehend von Indien und dem indischen Subkontinent auf eine Vielzahl Länder weltweit. Dies ist der einzige Genotyp unter den bereits existierenden, der nun als neue Art klassifiziert wurde. Zunächst, 2018, wurden die in Indien isolierten neuen Dermatophyten *T. mentagrophytes* Genotyp VIII als *T. interdigitale* klassifiziert. Dabei basierte diese Eingruppierung auf einer molekularen Identifizierung mittels Sequenzierung der *ITS*-Region der rDNA von Isolaten aus Delhi. Verglichen wurden die Sequenzen mit Vergleichssequenzen, welche in der Datenbank des National Center of Biotechnology Information (NCBI) hinterlegt waren, da bis 2016 noch alle Stämme innerhalb des Spezies-Komplexes *T. mentagrophytes/T. interdigitale* übereinstimmend als *T. interdigitale* klassifiziert wurden. Durch die Neufassung der Taxonomie zwischen 2016 und 2017 wurde in die beiden unterschiedlichen Spezies *T. mentagrophytes* (zoophil) und *T. interdigitale* (anthropophil) unterschieden (Nenoff, Verma, Uhrlaß et al., 2019).

Morphologisch betrachtet kann *T. indotineae* nicht von *T. mentagrophytes* unterschieden werden. Jedoch weist *T. indotineae* ein neues Übertragungsmuster auf (anthropophil statt zoophil) und eine hochgradige Terbinafin-Resistenz (Nenoff, Uhrlaß et al., 2022). *T. indotineae* ist ein schnell wachsender Dermatophyt, welcher zentral beige gefärbte, flache, mit Hyphenbündeln versehene, ausstrahlende Kolonien besitzt, die einen hellen, weißen Rand aufweisen. Darüber hinaus können die Kolonien auch eine körnig gipsartige, cremefarbene, gelbliche bis hellbraune Oberfläche ausbilden. Die Kolonienrückseite ist glatt und beige, gelb bis hellbraun pigmentiert, manchmal jedoch auch braunrot, ocker bis dunkelbraun gefärbt (Nenoff, Verma, Vasani et al., 2019).

Auch mikroskopisch ist *T. indotineae* nicht von den anderen Genotypen des *T. mentagrophytes/T. interdigitale*-Komplexes zu unterscheiden. Ebenso wie die weiteren Genotypen von *T. mentagrophytes* ist *T. indotineae* reichlich sporulierend. Die kugelig runden Mikrokonidien ordnen sich in Botrytis- oder Traubenform an. Dagegen weisen die glatten, dünnwandigen Makrokonidien Keulen- oder Zigarrenform auf. Außerdem finden sich verschieden große, runde bis ovale und deformierte Chlamydosporen. In älteren Kulturen sind weiterhin oft reichlich Spirallyphen zu sehen (Nenoff, Verma, Vasani et al., 2019). Abbildung 1.2 zeigt das mikroskopische Bild von *T. indotineae* mit zahlreichen runden Mikrokonidien und Chlamydosporen (a). In Teil b sind Spirallyphen und Mikrokonidien zu erkennen und in Teil c ist Pilzmyzel dargestellt. Im unteren rechten Bildteil ist eine Zigarren-förmige, fast spindelartig geformte Makrokonidie von *T. indotineae* gezeigt.

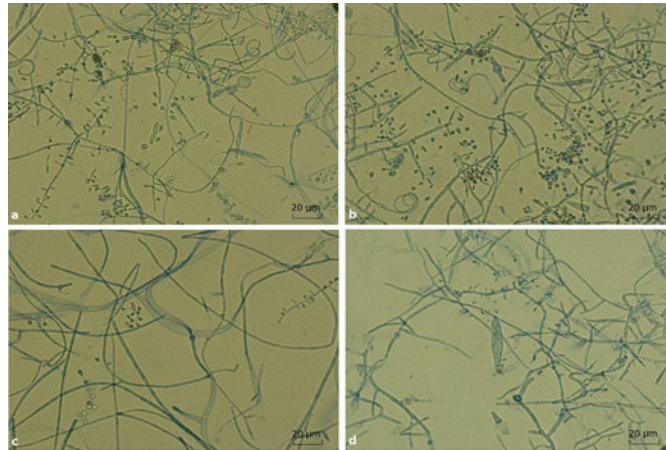


Abbildung 1.2: Mikroskopische Aufnahmen von *T. indotineae*
 a: zahlreiche runde Mikrokonidien und Chlamydosporen, b: Spirallyphen und Mikrokonidien, c:
 Pilzmyzel, d: Zigarren-förmige, fast spindelartig geformte Makrokonidie

Durch *T. indotineae* ausgelöste Dermatomykosen betreffen primär den Hautfaltenbereich in den Leisten und im Schritt sowie gluteal. Ausgehend von einer Tinea cruris entwickelt sich eine Tinea corporis mit Beteiligung der Gluteal- und Oberschenkelregion. Daneben ist eine Ausbreitung auf den gesamten Körperstamm möglich. Die auftretenden Hautveränderungen sind hoch entzündlich und stark juckend (Nenoff, Verma, Vasani et al., 2019).

Da *T. indotineae* weder makroskopisch noch mikroskopisch eindeutig identifiziert werden kann, ist eine klare Differenzierung mittels Sequenzierung der Internal Spacer (ITS) Region der rDNA erforderlich. Des Weiteren kann *T. indotineae* mittels PCR-basierter Methoden analysiert werden. Allerdings sind die aktuell verfügbaren kommerziellen PCR-Systeme nicht in der Lage, den Genotyp VIII von *T. mentagrophytes* bzw. *T. indotineae* zu erkennen. Entweder wird die Spezies pauschal als dem *T. interdigitale*/*T. mentagrophytes* zugehörig identifiziert (Real-Time (RT)-PCR), oder der Pilz wird zwar richtig als *T. mentagrophytes* nachgewiesen, kann dann jedoch nicht als Genotyp VIII erkannt werden (PCR/Microarray) (Heidemann, Monod und Gräser, 2010).

Bei den beschriebenen chronisch-rezidivierenden Dermatomykosen hat Terbinafin weder topisch, noch systemisch appliziert, eine Wirkung. Überwiegend besteht eine *In vitro*-Resistenz von *T. indotineae* gegenüber Terbinafin. Mittel zur Wahl zur Behandlung einer Onychomykose durch diesen Erreger ist Itraconazol. Die Dosierung beträgt dabei 100 mg Itraconazol zweimal täglich für vier bis acht Wochen. Neuerdings wird auch das besser bioverfügbare SUBA (Super Bioavailability)-Itraconazol erfolgreich eingesetzt. Aufgrund der besseren Resorption sind hierbei 50 mg ausreichend, zweimal täglich für den gleichen Zeitraum. Für die anderen oralen Antimykotika wie Fluconazol oder Griseofulvin finden sich, wie für Terbinafin, ebenfalls erhöhte minimale Hemmkonzentrationen (MHK) gegen *T. indotineae*. Zur Lokalthherapie kommen Amorolfin, Azolantimykotika und Ciclopirox in Betracht (Klonowski und Nenoff, o.A.[a]).

1.3 Arten von Dermatophyten-Erkrankungen

Beim Menschen verursachen Dermatophyten verschiedene Arten von Erkrankungen der Haut und Haaranhangsgebilde. Das klinische Bild richtet sich dabei nach der Art des Pilzes und der spezifischen Abwehrreaktion des Organismus. Da sich Dermatophyten von Keratin ernähren, sind Haut, Haare und Nägel betroffen (Onmeda-Redaktion, 2021). Die „Tinea“ (lat. Halzwurm oder Motte) ist der historisch entstandene Begriff für eine Dermatophyten-Infektion des behaarten Kopfes, die zu einem „Motten zerfressenen“ Aussehen der Kopfhaut führt (Nenoff, Krüger, Schaller et al., 2014).

Die folgende Tabelle 1.1 stellt eine Übersicht über die wichtigsten Haut- und Nagelerkrankungen dar, welche durch Dermatophyten ausgelöst werden. Dabei sind der Ort des Pilzbefalls und der Ort der Infektion identisch.

Tabelle 1.1: Überblick über die durch Dermatophyten ausgelösten Erkrankungen und der befallenen Regionen (Mayser et al., 2020)

Erkrankung	Synonym	befallene Region	Erreger
Tinea unguium	Onychomykose	Nägel	<i>E. floccosum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. interdigitale</i>
Tinea barbae	Bartflechte	Barthaar	<i>T. verrucosum</i> , <i>T. mentagrophytes</i>
Tinea corporis	Ringelflechte	unbehaarte Haut, große Hautfalten	<i>M. canis</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>E. floccosum</i>
Tinea pedis	Athletenfuß, Sportlerfuß, Fußpilz	Falten zwischen den Zehen	<i>E. floccosum</i> , <i>T. interdigitale</i> , <i>T. rubrum</i>
Tinea capitis		behaarte Kopfhaut	<i>M. canis</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>T. benhamiae</i>
Tinea inguinalis = Tinea cruris		Leistenbereich, Hinterbacken	<i>E. floccosum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. interdigitale</i>
Tinea manuum		Hände	überwiegend <i>T. rubrum</i>
Tinea faciei		Gesicht	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. interdigitale</i> , <i>T. benhamiae</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>M. canis</i>

Bei der Tinea unguium handelt es sich um eine Dermatophyteninfektion der Nägel. Eine solche Nagelpilzinfektion beginnt überwiegend am distalen, freien Rand der Zehennägel. Die Zehennägel sind dabei häufiger betroffen als Fingernägel. Außerdem kommt

die Tinea unguium bei Erwachsenen öfter vor als bei Kindern. Das zunehmende Alter, Diabetes, schlechter venöser und lymphatischer Abfluss, schlecht sitzende Schuhe und sportliche Betätigung sind dabei Risikofaktoren für diese Art der Pilzinfektion. Das klinische Bild der Tinea unguium ist davon abhängig, ob der Pilz den distalen, proximalen oder oberflächlichen Nagel befallen hat. Der distale Befall ist das häufigste Erscheinungsbild, wobei der betroffene Nagel hyperkeratotisch (übermäßig verhornt), kreidig und stumpf ist. Die bräunlich-gelben Ablagerungen, welche unter dem Nagel entstehen, führen dazu, dass sich der Nagel von seinem Bett löst, wodurch die Nagellatte brüchig werden kann. Eine proximale Onychomykose kommt selten vor und tritt häufiger bei immunsupprimierten Patienten, vorzugsweise bei HIV-Positiven oder AIDS-Kranken, auf (Noble, Forbes und Stamm, 1998).

Eine seltene Dermatomykose ist die Tinea barbae, welche die Haare und Haarfollikel von Bart und Schnurbart befällt, weshalb sie auch „Bartflechte“ genannt wird (Bonifaz, Ramírez-Tamayo und Saúl, 2003). Verantwortliche Erreger können *T. verrucosum* und *T. mentagrophytes* sein (Nenoff et al., 2022), aber auch *T. rubrum*, *M. canis* oder auch *T. tonsurans* (Bonifaz, Ramírez-Tamayo und Saúl, 2003).

Als Tinea corporis, welche auch als „Ringelflechte“ bezeichnet wird, wird eine entzündliche Dermatomykose der lanugobehaarten (Flaumhaar) Haut des Rumpfes, der Extremitäten und des Gesichts beschrieben. Sie äußert sich als runde, erythematöse (gerötete) juckende Läsion (Verletzung) mit randständiger Schuppung. In diesen Randläsionen befinden sich vitale Pilzhyphen, welche die entzündliche Reaktion der Haut auslösen (Höck, 2012). Diese Art der Tinea kommt vor allem bei Kindern und Erwachsenen vor, die in heißem und feuchten Klima leben (Noble, Forbes und Stamm, 1998). Meist ist *T. tonsurans* ursächlich für diese Form. Bei Erwachsenen ist die Ursache der Tinea corporis überwiegend *T. rubrum*, gelegentlich auch *T. interdigitale* (Nenoff, Krüger, Schaller et al., 2014), *M. canis* oder *E. floccosum* (Seebacher, Bouchara und Mignon, 2008).

Eine der häufigsten Dermatomykosen und verbreitetsten Infektionskrankheiten des Menschen ist die Tinea pedis, welche eine Pilzinfektion der Füße beschreibt (Höck, 2012). Als Tinea interdigitalis im Zehenzwischenraum mit hyperkeratotischen, trockenen und schuppenden Läsionen beginnend, bilden sich später auch nässende und erosive Läsionen. Das klinische Bild ist nicht erregerspezifisch und kann demnach von verschiedenen Dermatophyten-Arten verursacht werden, wie bspw. *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* oder *T. rubrum*. Bei der Tinea pedis ist Juckreiz mäßig ausgeprägt. Im Verlauf der Infektion kommt es durch Rhagadenbildung (Einrisse in trockener Haut) zu Brennen und Schmerzen. Durch zusätzliche Infektionen mit grampositiven und gramnegativen Erregern kommt es zur Mazeration (Aufweichung der Haut) und zum Foetor (übler Geruch) (Nenoff, Krüger, Schaller et al., 2014).

Die Tinea capitis („Ringelflechte der Kopfhaut“) betrifft vorwiegend Kinder im Schulalter. Sie äußert sich oft als ein oder mehrere ringförmige Flecken mit entzündlicher oder nicht entzündlicher Alopezie, d.h. übermäßigem Haarausfall. Nicht entzündete Bereiche, welche für eine Infektion mit *T. tonsurans* charakteristisch sind, können als schwarze Punkte erscheinen, bei denen es sich in Wirklichkeit um infizierte, an der Kopfhaut abgebrochene Haarschäfte handelt. In einigen Fällen tritt die Tinea capitis allerdings nur

als unspezifische Schuppenbildung auf. *Micropsorum*-Infektionen zeigen sich wiederum als graue Flecken mit glanzlosen Haaren, welche mit Sporen bedeckt sind. Entzündete Stellen weisen dabei in der Regel, Schuppen, Pusteln und Rötungen auf. Vereinzelt entwickeln Patienten ein lokalisiertes, sumpfiges, verhärtetes Granulom, welches als Kerion bezeichnet wird und zu Narbenbildung und dauerhaftem Haarausfall führen kann (Noble, Forbes und Stamm, 1998).

Die Tinea inguinalis, auch Tinea cruris genannt, ist eine Pilzinfektion der Leistenbeuge. Diese Infektion beginnt in den Hautfalten der Genitalregion und kann sich beidseitig auf die inneren Oberschenkel ausbreiten. Der Ausschlag hat eine schuppige, rosafarbige Abgrenzung und kann stark juckend und schmerzhaft sein. Männer und Adipöse Menschen sind dabei gefährdeter, da zwischen dem Hodensack und den Oberschenkeln bzw. den Hautfalten Feuchtigkeit eingeschlossen werden kann. Auch kommt diese Infektion häufig bei warmem Wetter vor oder wenn warme und feuchte Kleidung getragen wird (Aaron, 2023).

Die Pilzerkrankung der Hand wird als Tinea manuum oder Tinea manus bezeichnet. Diese Infektion ist hochgradig ansteckend und sollte schnellstmöglich behandelt werden. Meistens rötet sich die Haut und beginnt zu schuppen und zu jucken. In schweren Fällen treten auch tiefe Risse auf und der Hautpilz schränkt die Bewegungsmöglichkeit der Hand ein. Diese Art der Dermatophyten-Erkrankung ist sehr selten. Im Jahr 2020 wurden in Deutschland 14 Fälle diagnostiziert (Redaktion, 2022). Dabei ist der verursachende Erreger überwiegend *T. rubrum* (Nenoff et al., 2022).

Tinea faciei ist eine relativ seltene oberflächliche Dermatophyteninfektion, die auf die kahle Gesichtshaut beschränkt ist. Sie tritt in der Regel bei pädiatrischen Patienten auf. Obwohl die identifizierenden Organismen und die Behandlungsmethoden die gleichen sind, wie bei anderen oberflächlichen Pilzinfektionen, wird diese klinisch und histologisch häufig falsch diagnostiziert (Lin, Szepietowski und Schwartz, 2004). Auslösende Dermatophyten sind dabei *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. rubrum* und *M. canis* (Onmeda-Redaktion, 2021).

1.4 Behandlung von Dermatomykosen

Die Behandlung dieser Dermatomykosen basiert auf dem klinischen Bild und dem mykologischen Erregernachweis. Dafür steht eine Vielzahl topisch (oberflächlich) applizierbarer, aber auch systemischer Antimykotika zur Verfügung. Dabei ist das Wirkspektrum der topischen Antimykotika oft breit und beinhaltet Dermatophyten, Hefe- und Schimmelpilze, teilweise sogar grampositive Bakterien. Wiederum gibt es topische Antimykotika, welche ein beschränktes Wirkspektrum haben, wie z.B. Polyene, welche nur bei Infektionen durch Hefepilze und einige Schimmelpilze einsetzbar sind (Nenoff, Krüger, Paasch et al., 2015).

1.4.1 Antimykotika

Wirkstoffe zur Behandlung von Pilzinfektionen werden in der Humanmedizin als Antimykotika bezeichnet. Azol-Fungizide zählen zu einer der wichtigsten Wirkstoffgruppe im Pflanzenschutz. Derivate dieser Azole besitzen aber auch bei der Behandlung von systemischen Pilzinfektionen des Menschen eine besondere Bedeutung, da diese Wirkstoffe im Vergleich zu anderen Verbindungen, wie bspw. Amphotericin B, weniger toxisch und daher häufig die einzige therapeutische Alternative sind. Die Azol-Derivate besitzen ein Diazol- oder Triazol-Grundgerüst, welches für die antimykotische Aktivität dieser Verbindungen verantwortlich ist und viele chemische Modifikationen zulässt (BgVV, 2001). Die fungizide Wirkung der Azole beruht auf der Blockierung der Biosynthese von Ergosterol, einem essentiellen Bestandteil der Zellmembran von Pilzen. Durch die Einlagerung falscher Sterole wird die normale Membranfunktion gestört und die Funktion membranständiger Enzyme wird beeinträchtigt. Das Zellwachstum und die Zellteilung sind damit behindert, wodurch die Azole ihre fungizide Wirkung erhalten (Lares, 2000). Azole hemmen dementsprechend das Enzym Lanosterol-14- α -Demethylase, das zu den pilzspezifischen Cytochrom-P450-Enzymen gehört, und unterbinden dadurch die oxidative Demethylierung der Ergosterol-Vorstufe Lanosterol (BgVV, 2001).

In der Humanmedizin finden Azol-Antimykotika ihre Anwendung, da sie ein breites Wirkungsspektrum besitzen und dadurch sowohl zur systemischen Behandlung von Infektionen mit Hefen, wie *Candida*- und *Cryptococcus*-Arten, und Schimmelpilzen, wie *Aspergillus*-Arten, als auch zur topischen Anwendung auf der Haut bei Infektionen mit Dermatophyten, wie *Trichophyton*, *Epidermophyton* und *Microsporum* eingesetzt werden (BgVV, 2001).

Tabelle 1.2: In Deutschland zugelassene Azol-Antimykotika in der Humanmedizin (2001) (BgVV, 2001)

Wirkstoff	Anwendung
Bifonazol	Dermal
Clotrimazol	Vaginal, dermal
Croconazol	Dermal
Econazol	Vaginal, dermal
Fluconazol	Systemisch
Fenticonazol	Vaginal, dermal
Isoconazol	Dermal
Itraconazol	Systemisch, dermal
Ketoconazol	Systemisch, dermal
Miconazol	Vaginal, dermal
Oxiconazol	Vaginal, dermal
Sertaconazol	Dermal
Tioconazol	Dermal

In der Tabelle 1.2 sind die in Deutschland zugelassenen Azol-Antimykotika der Humanmedizin aufgelistet. Für die systemische Behandlung stehen dabei die Wirkstoffe Itraco-

nazol, Ketoconazol und Fluconazol zur Verfügung. Die letztgenannte Substanz wird ausschließlich systemisch angewendet und ist wirksam gegen *Candida*- und *Cryptococcus*-Arten, aber unwirksam gegen *Aspergillus*-Arten und die meisten anderen Erreger systemischer Hyphenmykosen. Itraconazol wird bei Infektionen durch Dermatophyten, Hefen und *Aspergillus* sowie zahlreicher anderer Infektionserreger eingesetzt. Ketoconazol wird bei Dermatophyten, *Candida*-Arten und anderen pathogenen Pilzen eingesetzt, ist aber gegenüber Schimmelpilzen und *Cryptococcus* unwirksam. Die ausschließlich lokal angewendeten Azol-Derivate Bifonazol, Clotrimazol, Econazol, Isoconazol, Miconazol, Oxiconazol und Tioconazol sind gegen Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze wirksam. Bifonazol und Clotrimazol wirken außerdem gegen andere Pilze wie *Malassezia furfur* und bei Infektionen durch *Corynebacterium minutissimum*. Fenticonazol ist gegen Dermatophyten und Hefen, jedoch nicht gegen *Aspergillus*-Arten wirksam. Croconazol wird gegen Dermatophyten, Hefen und *Malassezia furfur* und Sertaconazol gegen Dermatophyten und Hefen angewendet (BgVV, 2001).

Des Weiteren werden wie in Kapitel 1.4 genannt, Allylamin-Antimykotika, wie beispielsweise Terbinafin, verwendet. Diese Antimykotika wirken über eine Hemmung der Squalenepoxidase in der Zellmembran der Pilze. Dies resultiert in der Hemmung der Ergosterolsynthese. Der Ergosterolinmangel und die intrazelluläre Ansammlung von Squalen führen zum Tod der Pilzzelle, worin die fungizide Wirkung besteht (PZ-Redaktion, 1997). Dabei kann Terbinafin oral, intravenös oder auch lokal appliziert werden und reichert sich in fetthaltigen Geweben, wie Haut, Haaren und Nägeln, besonders gut an. Terbinafin hat ein breites Wirkungsspektrum bei Pilzinfektionen der Haut und der Nägel, verursacht durch Dermatophyten wie *Trichophyton*, *Microsporum* und *Epidermophyton floccosum* (Nenoff et al., 2022).

1.4.2 Anwendung der Antimykotika auf Dermatophyten-Erkrankungen

Die Behandlung der Onychomykose stellt eine Herausforderung für Dermatologen dar. Zum einen sprechen durch Schimmelpilze ausgelöste Onychomykosen meist nicht auf systemische Antimykotika an (Wollina et al., 2016). Des Weiteren ist die Indikationsstellung für eine rein topische Therapie der Onychomykose oft falsch, da die Nagelpilzinfektion bereits zu ausgeprägt ist. Dies betrifft insbesondere die Anwendung des antimykotischen Nagellacks, welcher als OTC (Over-the-counter)-Präparat meist schon vor dem Besuch der Hautarztpraxis vergeblich angewendet wurde. Die Indikation zur systemischen Therapie der Onychomykose ist der Befall der Nagelmatrix durch die Erreger. Dabei ist Terbinafin nach wie vor das Mittel der Wahl zur innerlichen Behandlung. Auch für Kinder mit Onychomykose gelten Terbinafin und Itraconazol als sichere und wirksame Therapieoptionen. Jedoch sind beide Antimykotika zumindest in Deutschland nicht für das Kindesalter zugelassen (Nenoff, Krüger, Paasch et al., 2015).

Nachfolgende Tabelle zeigt verschiedene Therapiemöglichkeiten bei einer Onychomykose. Eine limitierte Onychomykose ohne Matrixbeteiligung kann rein topisch behandelt

werden. Dagegen sollte bei Matrixbeteiligung, oft erkennbar an den sogenannten „yellow streaks“, systemisch antimykotisch, in der Regel in Kombination mit einem topischen Mittel, behandelt werden. Entscheidend für die Therapieform sind außerdem die Anzahl der betroffenen Zehen- oder Fingernägel, Ausmaß des Nagelbefalls, Arzneimittelwechselwirkungen und die nachgewiesenen Erreger. Dabei ist in der topischen Anwendung Ciclopiroxolamin-Nagellack wirksamer als Amorolfin (Wollina et al., 2016).

Tabelle 1.3: Therapie einer Onychomykose (Wollina et al., 2016)

Die Therapiedauer beträgt in der Regel 6 Wochen bei Fingernagelbefall und 12 Wochen bei Zehnnagelbefall

Therapie	Indikation	Wirkstoffe	Dosierung und Heilungsrate
atraumatische Nagelextraktion	vor spezifischer Therapie	Harnstoff 20-40 % mit Okklusion	täglich, Heilungsrate nicht bekannt
antimykotischer Nagellack	Monotherapie nur bei < 50% betroffener Nagelfläche und maximal drei befallenen Nägeln, kein Nagelmatrixbefall	Ciclopiroxolamin	täglich 48 Wochen, 58,3 %
		Amorolfin	1 x pro Woche für 48 Wochen, 26,7 %
systemische Antimykotika	Nagelbefall > 50%, > 3 Nägel betroffen oder proximal-subunguale Onychomykose	Terbinafin	250 mg/d 6 - 12 Wochen, 76 %
		Itraconazol	2 x 200 mg/d für eine Woche, danach 3 Wochen Pause und Wiederholung
			6-12 Wochen (Pulstherapie), 63 %
			200 mg/d täglich über 6 - 12 Wochen (kontinuierliche Therapie), 69 %
	Fluconazol	150-300 mg 1 x pro Woche für 3 - 12 Monate, 48 %	
Lasertherapie	noch in der Diskussion	verschiedene Lasertypen	-

Bei einem Dermatophyten-Nachweis sollte mit Terbinafin, Fluconazol oder Itraconazol behandelt werden. Je nach Präparat sind die kontinuierliche und die intermittierende Therapie möglich mit den höchsten Ansprechraten unter Terbinafin. Onychomykosen, welche durch Schimmelpilze ausgelöst wurden, sprechen, wie bereits erwähnt, meist nicht auf systemische Antimykotika an. Bei Infektionen mit *Aspergillus*-Arten und *Scorpariopsis brevicaulis* kann ein Therapieversuch mit Terbinafin oral erfolgreich sein. Des

Weiteren bleibt die Möglichkeit der atraumatischen Nagelentfernung mit 40 % Harnstoff. Die Lasertherapie bleibt bisher weiterhin in der Diskussion (Wollina et al., 2016).

Antimykotischer Nagellack kann bei leichten oder mäßig ausgeprägten Infektionen der Nägel angewandt werden. Bisher gibt es jedoch keinen Konsens, was genau unter einer milden Infektion zu verstehen ist. Als Indikation für antimykotischen Nagellack wird eine Onychomykose angesehen, welche bis zu 50 % der Nagelfläche betrifft (Wollina et al., 2016) oder der Befall von maximal drei Nägeln. Dem steht entgegen, dass zum Amorolfin-haltigen Nagellack als Anwendungsgebiet einer Onychomykose der Befall mit < 80 % angegeben ist. Bei der Prognose einer Onychomykosebehandlung spielen jedoch weitere Faktoren, wie Erreger, Lebensalter, Dauer der Onychomykose und Nagelwachstum eine ausschlaggebende Rolle (Nenoff, Krüger, Paasch et al., 2015).

Bei Dermatomykosen (Tinea) richtet sich die Therapie nach dem Ausmaß der Pilzinfektion. Zur Behandlung der Tinea ist es in einigen Fällen ausreichend, Antimykotika in Form von Cremes oder flüssigen Lösungen auf die betroffenen Stellen aufzutragen. Geeignet sind dabei Substanzen wie zum Beispiel Terbinafin oder Miconazol. Bei starken Entzündungssymptomen wie Rötung, Juckreiz und Brennen können zusätzlich lokal wirksame Glukokortikoide in Form von Cremes oder Salben zum Einsatz kommen. In einigen Fällen ist es erforderlich zur Therapie zusätzlich ein Medikament einzunehmen. Bei einer Tinea werden häufig Wirkstoffe wie Griseofulvin, Terbinafin, Itraconazol oder Fluconazol, die gegen Dermatophyten wirken, verwendet. Zur Behandlung der Tinea können jedoch auch sogenannte Breitspektrum-Antimykotika zum Einsatz kommen, die zusätzlich Hefepilze und einige Bakterien beseitigen (Nenoff et al., 2022).

Für Dermatophyten ist eine Vielzahl von antimykotischen Substanzen mit starker Wirkung verfügbar. Bei einer Tinea pedis ist die Behandlung von der Form der Tinea abhängig, wobei sich verschiedene Verabreichungen bewährt haben. Die Notwendigkeit der Therapie einer Tinea pedis ergibt sich daraus, dass Mazerationen, Phagaden und Abschilferungen des Stratum corneum im Zehenzwischenraum Eintrittspforten für beta-hämolyisierende Streptokokken sein können. Bei der mazerierten, erosiven sowie sekundär bakteriell infizierten interdigitalen Tinea pedis sind Antimykotika als Lösungen, Gel oder Spray zu bevorzugen. Bei der trockenen und schuppigen hyperkeratotischen Tinea pedis ist eine Creme oder Salbe vorzuziehen. Neben Imidazolen, wie bspw. Bifonazol oder Clotriconazol, bieten sich zur topischen Therapie u.a. das Hydroxypyridon Ciclopiroxolamin, das Allylamin Terbinafin, das Morpholin Amorolfin und Thiocarbamate an. Die übliche Anwendungsfrequenz der meisten topischen Antimykotika bei einer Tinea pedis beträgt zweimal täglich. Clotriconazol soll zwei- bis dreimal täglich angewendet werden, Sertaconazol zweimal täglich, Bifonazol und Terbinafin dagegen nur einmal täglich. In der Regel umfasst der Behandlungszeitraum vier Wochen, entsprechend der Regenerationszeit der Epidermis. Bei ausgeprägten Formen, insbesondere bei der plantaren Tinea pedis und der hyperkeratotischen Tinea pedis, ist eine systemische antimykotische Behandlung notwendig. Die orale Behandlung ist auch bei chronischem Verlauf indiziert, bzw. wenn die topische Therapie versagte (Nenoff, Krüger, Paasch et al., 2015).

Eine Übersicht über Antimykotika zur topischen Anwendung mit den jeweiligen Zubereitungsformen und antimikrobiellem Spektrum ist in Tabelle 1.4 dargestellt.

Tabelle 1.4: Topische Antimykotika mit dem jeweiligen antimikrobiellen Spektrum (Nenoff, Krüger, Paasch et al., 2015)

D: Dermatophyten, H: Hefepilze, S: Schimmelpilze

Wirkstoffgruppe	Substrat	Zubereitungsform	Antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber			
			D	H	S	Bakterien
Allylamine	Terbinafin	Creme, Gel, Lösung, Spray	×	×		
Imidazole	Bifonazol	Creme, Spray, Lösung, Gel, Salbe	×	×		<i>Corynebacterium minutissimum</i>
	Clotriconazol	Creme, Lösung, Gel, Paste, Puder, Spray, Vaginaltabletten, -zäpfchen, -creme	×	×	×	<i>Corynebacterium minutissimum</i>
	Sertaconazol	Creme, Lösung	×	×	×	Grampositive Bakterien (Staphylokokken, Streptokokken)
Morpholin-Derivat	Amorolfin-HCl	Nagllack, Creme	×	×	×	<i>Actinomyces</i> spp., <i>Propionibacterium acnes</i>
Pyridon-Derivat	Ciclopiroxolamin	Creme, Gel, Lösung, nagellack, Puder, Shampoo, Vaginalcreme	×	×	×	
Thiocarbamate	Tolnaftat	Lösung, Creme	×			

Im Jahr 1959 wurde das fungistatisch wirkende Benzofuran Griseofulvin als einziges Medikament eingeführt, welches uneingeschränkt zur systemischen Therapie der Tinea capitis bei Kindern zugelassen wurde, ungeachtet dessen, dass es sich um einen Mitosehemmstoff mit erheblichen unerwünschten Wirkungen handelt. Griseofulvin gilt bis heute weltweit als „Goldstandard“. Demnach werden die neuen Antimykotika hinsichtlich ihrer Wirkung und Sicherheit immer noch an Griseofulvin gemessen. Alternativen sind die in Deutschland für Kinder jedoch nicht zugelassenen Triazole Fluconazol und Itraconazol, außerdem das Allylamin Terbinafin. Dabei kann Fluconazol ab dem 2. Lebensjahr eingesetzt werden, vorausgesetzt es besteht keine therapeutische Alternative. Itraconazol ist im Kindes- und Jugendalter in Deutschland ebenfalls nicht zugelassen. Auch Terbinafin ist vor dem 18. Lebensjahr in Deutschland nicht zugelassen (Nenoff, Krüger, Paasch et al., 2015).

In Tabelle 1.5 sind diese systemischen Behandlungsmethoden der Tinea capitis dargestellt.

Tabelle 1.5: Systemische Therapie der Tinea capitis mit Ausnahme von Infektionen, die durch *M. canis* bedingt sind (Seebacher und Abeck (2003) und Nenoff, Krüger, Paasch et al. (2015))

Wirkstoff	Form	Dosierung/Tag	Therapiedauer
Griseofulvin	Tabletten	10 - 15 mg/kg KG (heute 20 mg/kg; einmal täglich nach dem Essen)	6 - 12 Wochen oder länger bis Kultur negativ
Itraconazol	(Hart-)Kapseln, Lösung	5 mg/kg KG (einmal täglich zusammen mit der Hauptmahlzeit)	2 - 6 Wochen o. Pulstherapie
Terbinafin	Tabletten	< 20 kg: 62,5 mg 20 - 40 kg: 125 mg > 40 kg: 250 mg täglich	<i>T. spp.</i> : 2-4 Wochen; <i>M. spp.</i> : 8 - 12 Wochen
Fluconazol	Hartkapseln, Saft, Trocken-saft, Infusionslösung	Dosisfindungsuntersuchungen sind noch nicht abgeschlossen 6 mg/kg KG täglich 8 mg/kg KG einmal wöchentlich	3 - 6 Wochen; 8 - 12 Wochen

Die effektivste Behandlung der Tinea capitis ist demnach durch orale Antimykotika möglich. Die Therapie ist erforderlich, da topische Antimykotika die vom Erreger befallenen Haarfollikel nicht ausreichend penetrieren können. Eine zusätzliche lokale Behandlung mit einem topischen Antimykotikum, wie zum Beispiel Ciclopiroxamin, Terbinafin, Tolnaftat oder Tolciclat wird unter dem Punkt der Verringerung der Infektionsgefahr für andere Personen empfohlen. Dabei sollte diese Behandlung nicht ausschließlich den befallenen Bereich betreffen, sondern auch umliegende Haare in ihrer gesamten Länge, da sich auch hier Pilzsporen befinden können (Seebacher und Abeck, 2003).

Griseofulvin ist bei der Tinea capitis ausgelöst durch *Microsporum*-Arten wirksamer als Terbinafin. Fluconazol und Itraconazol haben eine vergleichbare Wirksamkeit und Therapiedauer wie Griseofulvin. Allerdings haben Fluconazol und Itraconazol weniger Nebenwirkungen und sind als Lösungen verfügbar, weshalb Griseofulvin in Deutschland nicht das Mittel der Wahl ist. Seit 2018 ist Griseofulvin außerdem in Deutschland nicht mehr verfügbar (Mayser et al., 2020). Bei Tinea capitis ausgelöst durch *Trichophyton*-Arten reicht eine zwei- bis vierwöchige Therapiedauer mit synthetischen Triazolen und Terbinafin. *M. canis*-Infektionen der Kopfhaut müssen in der Regel mit allen Antimykotika deutlich länger behandelt werden. Im Einzelfall muss das systemisch wirksame Antimykotikum bis zu 12 oder 16 Wochen eingenommen werden (Nenoff, Krüger, Paasch et al., 2015).

1.4.3 Resistenzentwicklung

In der Medizin wird von einer Resistenz oder Widerstandsfähigkeit gesprochen, wenn ein Organismus zum Beispiel vor Viren oder Giften geschützt wird. Beim Menschen gibt

es Resistenzen, die den Körper vor Infektionen schützen. Aber auch Krankheitserreger selbst können Resistenzen entwickeln. Zum Beispiel können Bakterien gegen Antibiotika resistent werden. Diese wirken dann weniger gut oder gar nicht gegen diese resistenten Bakterien (IQWiG, o.A.). Primäre, oder intrinsische, Resistenzen sind von Natur aus vorhanden und führen dazu, dass eine gesamte Spezies gegen eine Substanz oder Substanzklasse resistent ist. Bis zum Ende des 20. Jahrhunderts war die Resistenzlage bei humanpathogenen Pilzen im Wesentlichen durch solche primären Resistenzen bestimmt. Dabei sind beispielsweise einige *Trichophyton*-Arten resistent gegen Amphotericin B. Weiterhin besitzen *Aspergillus*-Arten eine Fluconazol-Resistenz (Kurzai und Cornely, 2020).

Weltweit wird die zunehmende Resistenzentwicklung der Dermatophyten gegenüber Antimykotika beobachtet. Dabei handelt es sich um eine klinische Resistenz, erkennbar daran, dass eine Dermatomykose oder Onychomykose trotz adäquater oraler antimykotischer Therapie offensichtlich nicht mehr auf die Behandlung anspricht und es zu einer Verschlechterung kommt. Dem entspricht, nicht in allen Fällen, eine In-vitro-Resistenz oder zumindest eine verminderte In-vitro-Empfindlichkeit der jeweiligen Dermatophyten. Beobachtet wurde dies in vielen europäischen Ländern bei unterschiedlichen Dermatomykosen und verschiedenen Dermatophyten. An erster Stelle betreffen die Terbinafin-Resistenz und das Therapieversagen von Terbinafin jedoch Indien. Von dort aus hat sich der damals als *T. mentagrophytes* Genotyp VIII bezeichnete Dermatophyt *T. indotinea* über arabische Länder, u.a. das Emirat Dubai oder Bahrain, in Richtung Europa ausgebreitet. Ein Großteil der Isolate von *T. indotinea* ist in vitro resistent gegenüber Terbinafin und spricht nicht auf eine topische oder orale Behandlung mit diesem Allylamin an (Nenoff, Mayser und Uhrlaß, 2021). Dabei spielt das Gen zur Ausbildung der Squalenepoxidase eine große Rolle bei der Wirkungsweise der Antimykotika. Die Squalenepoxidase (*SQLE*), auch bekannt als Squalen-Monooxygenase, katalysiert die stereotypische Umwandlung von Squalen zu 2,3(S)-Oxidosqualen, einem Schlüsselschritt in der Cholesterin-Biosynthese. Die Hemmung von *SQLE* wird gezielt zur Behandlung von Hypercholesterinämie, Krebs und Pilzinfektionen eingesetzt (Padyana et al., 2019). Mutationen in diesem Gen sind ein möglicher Grund für das Versagen der Squalenepoxidase und der antimykotischen Interaktion, was zu einer Resistenz gegen antimykotische Medikamente führt (Rudramurthy et al., 2018). Wie bereits erwähnt, werden vor allem in Indien immer häufiger *T. mentagrophytes*-Stämme mit Resistenzen gegen Terbinafin und/oder Azole beobachtet. Dort existieren Resistenzraten von 30 % bis 50 %. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um den Genotyp VIII. Aus Deutschland wurde erstmals 2019 eine Tinea corporis durch einen Terbinafin-resistenten *T. mentagrophytes*-Stamm vom *ITS*-Genotyp VIII berichtet. Bei *T. mentagrophytes*-Stämmen vom *ITS*-Typ VIII sind diverse Punktmutationen im *SQLE*-Gen bekannt, die eine Resistenz gegen Terbinafin verursachen (Brasch et al., 2021).

Resistenzen gegen Azole, zu denen die älteren Imidazole, wie Ketoconazol und Miconazol, und die neueren Triazole, wie Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol, gehören, sind gegen die Lanosterol-Demethylase bei der Ergosterol-Biosynthese gerichtet. Ursachen einer Resistenz von Pilzen gegenüber Azolen können beispielsweise Veränderun-

gen der Zellwand sein, die den Imports des Antimykotikums behindern oder auch Veränderungen bei der intrazellulären Verstoffwechslung der Substanz. Weiterhin sind auch Änderungen bei dem Target-Enzym, bei anderen Enzymen der Ergosterol-Biosynthese oder bei den Efflux-Pumpen mögliche Ursachen einer Resistenz. Das Gen, welches die Lanosterol-Demethylase, den Hauptangriffsort der Azole, codiert, ist das *ERG11*-Gen. Inzwischen sind verschiedene Punktmutationen im *ERG11*-Gen bekannt welche zu einer Azol-Resistenz von Pilzen führen können (BgVV, 2001). Auch die Überexpression von Genen, die Multidrug-Transporter der ABC-Familie kodieren, führt zur Resistenz von Azolen. Dabei hat die wiederholte topische und systemische Behandlung mit diesen Antimykotika zur Entwicklung dieser Resistenzen bei Patienten beigetragen (Monod, Feuermann und Yamada, 2021).

1.5 Diagnostik

1.5.1 Breakpoint-Agardilution

Die Agar-Dilutionsmethode wird von Forschern zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) von Antimykotika verwendet. Bei diesem Test werden verschiedene Antibiotika, bzw. in diesem Fall Antimykotika, in unterschiedlichen Konzentrationen in die Platten mit geschmolzenem Medium gegeben. Dabei wird je ein Well einer Platte als Wachstumskontrolle verwendet, welche kein Antimykotikum enthält (Marroki und Bousmaha-Marroki, 2022). Die Platten werden bei einer Temperatur von 37 °C bebrütet. Je nach Erregertyp erfolgt die Bebrütung für mehrere Stunden oder Tage. Danach werden die Platten untersucht, um festzustellen, ob an den beimpften Stellen ein Wachstum des Erregers stattgefunden hat (Parija, 2009). Dabei ist die MHK die niedrigste Konzentration des Antimykotikums, welches das sichtbare Wachstum mit bloßem Auge vollständig hemmt, wobei eine einzelne Kolonie oder ein dünner Schleier im Bereich der beimpften Stelle nicht berücksichtigt wird (Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology und (ESCMID), 2000). Diese Methode gilt als der Goldstandard der Empfindlichkeitsüberprüfung bzw. als die genaueste Methode zur Messung der Resistenz von Bakterien, oder hier von Dermatophyten. Ein Vorteil ist dabei, dass die Ergebnisse der Agar-Dilution leicht reproduzierbar sind und zu wesentlich geringeren Kosten überwacht werden können als bei anderen Verdünnungsmethoden (I Wiegand, Hilpert und Hancock, 2008).

1.5.2 Multiplex Real-Time PCR

In dieser Arbeit wird eine Multiplex PCR in Verbindung mit der Real-Time PCR eingesetzt, um die Proben als Wildtyp oder Mutanten der Squalenepoxidase identifizieren zu können. Gleichzeitig soll der Genotyp der Stämme untersucht werden. Generell gewinnt die Multiplex-PCR in der Erregerdiagnostik immer mehr an Bedeutung. Die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR, ist eine revolutionäre Innovation von Kary Mullis aus den 1980er Jahren. Seitdem hat sich die PCR als weitverbreitete Anwendung in der biomedizinischen Forschung etabliert, da sie kleine Mengen spezifischer Nukleinsäuresequenzen nachweisen und quantifizieren kann. Neben der erhöhten Konzentration der amplifizierten Produkte, die als Amplikons bezeichnet werden, sind die Zuverlässigkeit und die Reproduzierbarkeit der Messungen zwischen verschiedenen Laboren von entscheidender Bedeutung, insbesondere wenn die Methode in einem klinischen Umfeld durchgeführt werden soll. Bei der quantitativen PCR (qPCR) handelt es sich um eine Weiterentwicklung dieser Methode, welche es dem Anwender ermöglicht, den Verlauf einer PCR-Reaktion in Echtzeit (Real-Time) zu verfolgen (Hawkins und Guest, 2017). Die Daten werden daher während des gesamten PCR-Prozesses erfasst statt am Ende der Reaktion. Bei der Real-Time PCR (qPCR) werden die Reaktionen anhand des Zeitpunktes während der Vervielfältigung charakterisiert, bei dem die Amplifikation eines Ziels erstmals erkannt wird, und nicht anhand angereicherter Mengen des Ziels nach einer festgelegten Anzahl von Zyklen. Je höher die anfängliche Kopienzahl des Nukleinsäureziels, desto früher wird ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz beobachtet (Biosystems, o.A.). Dabei wird in dieser Methode eine sequenzspezifische DNA-Sonde verwendet, die an einem Ende ein fluoreszierendes Reportermolekül und am anderen Ende ein Molekül enthält, das diese Fluoreszenz löscht (Hawkins und Guest, 2017). Das zentrale Prinzip der Real-Time PCR mit Hybridisierungssonden ist also der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET), ein physikalischer Prozess, bei welchem die Energie eines angeregten Fluoreszenzmoleküls strahlungsfrei auf ein zweites Fluoreszenzmolekül (Quencher) übertragen wird, wenn beide sich in räumlicher Nähe befinden (Konrad und Busch, 2010). Die Nähe der Reportersonde zum Quencher-Molekül verhindert den Nachweis von Fluoreszenz (Hawkins und Guest, 2017), da das Reportermolekül bei einer definierten Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt wird und gibt diese Energie aufgrund der Nähe zum Quencher weiter, der diese Energie aufnimmt. Voraussetzung dafür ist, dass sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt. Wird die räumliche Nähe der beiden Moleküle unterbrochen, kann die Energie gemessen und als ein Maß für die PCR-Reaktion ausgewertet werden (Konrad und Busch, 2010). Weiterhin führt die Spaltung der Sonde durch die 5'- bis 3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase zur ungelöschten Emission von Fluoreszenz. Somit führt die Zunahme des c-DNA-Amplikons, auf das die Reportersonde anzielt, während jedes PCR-Zyklus zu einem proportionalen Anstieg der Fluoreszenz des Reporters (Hawkins und Guest, 2017). Dieser Prozess ist in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.

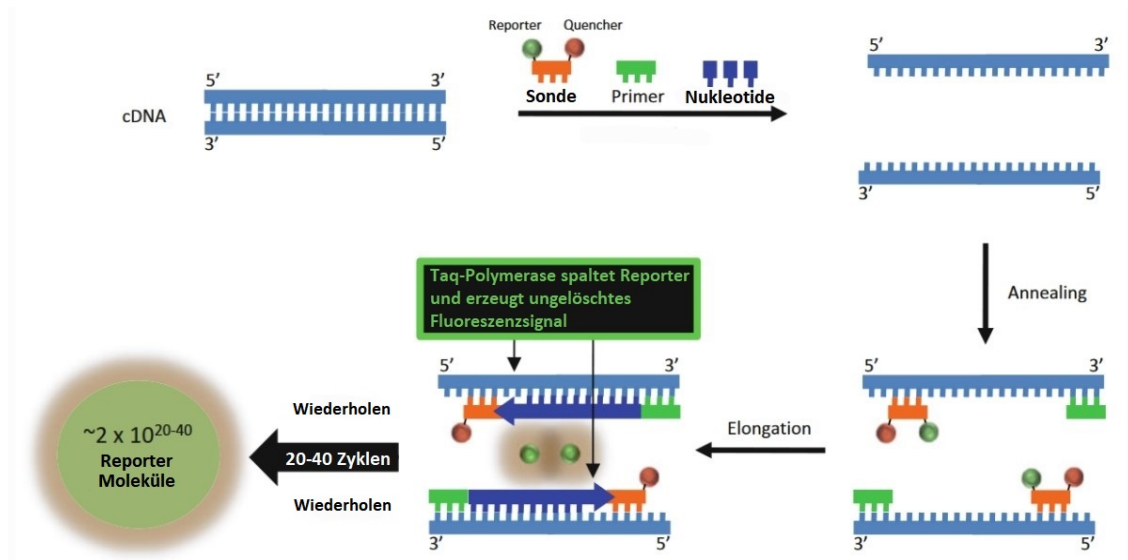


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der qPCR mit Denaturierung, Sonden- und Primer-Annealing und Elongation (verändert nach Hawkins und Guest (2017))

Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragments steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme mit dem Zuwachs an PCR-Amplikons direkt proportional. Die Auswertung der Analyse erfolgt über den sogenannten C_T -Wert („cycle threshold“ oder „threshold cycle“). Der C_T -Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporterfluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird. Der C_T -Wert ist dabei abhängig von der Anzahl an Template-Kopien, der Reaktions-effizienz, der Effizienz der Spaltung oder Hybridisierung der Sonden und der Sensitivität der Detektion. Je weniger Zyklen benötigt werden, um diesen Punkt zu erreichen, desto höher war die Kopienzahl der Ziel-DNA im Ausgangsmaterial (Konrad und Busch, 2010). Folgende Abbildung 1.4 zeigt die Auswertung des C_T -Wertes, wobei der Anstieg der Reporterfluoreszenz über das Grundrauschen zu erkennen ist. Weiterhin ist zu erkennen, dass sich die Negativkontrolle unterhalb des C_T -Wertes befindet.

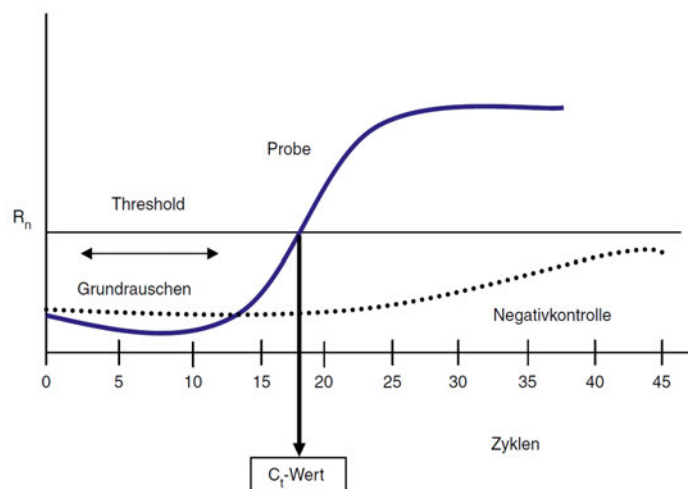


Abbildung 1.4: Ermittlung des C_T -Wertes einer Probe (Konrad und Busch, 2010)

Wie bei der Standard-PCR wird die qPCR normalerweise mit einem Thermocycler durchgeführt, welcher die Proben schnell erhitzen und abkühlen kann, um die Schmelz-, Annealing- und Verlängerungsphasen der Replikation zu ermöglichen. Bei der qPCR sollte der Thermocycler ebenfalls in der Lage sein, jede Probe mit spezifischen Lichtwellenlängen zu beleuchten, um die nach der Anregung der Sonde emittierte Fluoreszenz nachzuweisen. Die PCR besteht dabei normalerweise aus einer Reihe von Temperaturwechseln, die etwa 30 Mal wiederholt werden, wobei jeder Zyklus aus zwei oder drei Schritten besteht (Hawkins und Guest, 2017).

Bei einer Multiplex-PCR werden mehrere Einzel-PCR-Reaktionen unterschiedlichster DNA-Abschnitte oder Gene zu einem einzigen Reaktionsansatz unter identischen Bedingungen kombiniert. Die Auswertung erfolgt in Kenntnis der Fragmentlänge der einzelnen Primerkombinationen. Das Prinzip der Multiplex-PCR beruht auf dem sorgfältigen Zusammenführen zahlreicher Einzel-PCR-Reaktionen zu einem einzigen, gemeinsamen Reaktionsansatz. Dafür müssen die eingesetzten individuellen Primerkombinationen hinsichtlich der PCR-Bedingungen, wie z.B. der Annealing-Temperatur, optimiert und aufeinander abgestimmt werden (Arnemann, 2019). Voraussetzung für die Nutzung mehrerer Primerpaare ist, dass die Primer keine homologen Sequenzen amplifizieren, weil es sonst leicht zu Fehlannealing der Primer oder auch der Produkte kommt, wobei als Ergebnis ein Schmier im Agarosegel zu sehen ist. Generell wird der Nachweis der einzelnen Fragmente mit steigender Zahl an Primerpaaren immer schwieriger. Alternativ zur elektrophoretischen Auswertung gemäß Fragmentlänge, findet in dieser Arbeit die Auswertung mittels Real-Time PCR statt. Dabei bietet sich bei steigender Zahl der Fragmente an, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden zu verwenden (Mülhardt, 2013). Die Multiplex-PCR ist eine schnelle und effektive Methode zum Nachweis von chromosomalen Aberrationen. Damit lassen sich Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen innerhalb eines Genoms detektieren. Dafür ist die Kenntnis der zu amplifizierenden Sequenz vorausgesetzt. Davon werden Oligonukleotidpaare abgeleitet, die innerhalb der einzelnen Exons binden. In einem PCR-Ansatz lassen sich somit mehrere Oligonukleotidpaare vermengen. Die Detektion von Punktmutationen wird in der Regel durch Oligonukleotide erreicht, die in ihrem letzten 3'-Nukleotid das zum unveränderten Gen komplementär oder ein nichtkomplementäres Nukleotid aufweisen. Im ersten Fall werden bei nichtmutierter DNA die entsprechenden Amplikons erhalten, wohingegen bei einem Gendefekt, der Punktmutation, keine Vervielfältigung des spezifischen Exonbereichs nachzuweisen ist (Müller und Prange, 2016).

Wie bereits erwähnt erfolgt die Auswertung über den C_T -Wert, einer theoretischen Größe, die aus dem Schnittpunkt eines festgelegten unteren Werts (threshold) und einer gegebenen Amplifikationskurve abgeleitet wird. Diese gibt die relative Konzentration der anfänglich vorhandenen Ziel-DNA in der qPCR-Reaktion an. Dabei gibt es verschiedene, probenunabhängige Faktoren, welche einen mehr oder weniger deutlichen Einfluss auf den C_T -Wert haben. Dazu gehören das optische System, der PCR-Mastermix, Einstellungen des Threshold-Wertes und die Einstellung des Grundlinienwertes. Hinzu kommt, ob ein passiver Referenzfarbstoff, wie ROX für ein spezielles Gerät benötigt wird bzw. in der qPCR-Reaktion bereits vorhanden ist (bioscience, 2019). Bei dem ROX-

Farbstoff handelt es sich um ein Fluorphosphor, welcher als passiver Referenzfarbstoff für die qPCR verwendet wird, um die Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffs, wie beispielsweise dsGreen oder *TaqMan*-Sonden, zu normalisieren (Solutions, o.A.). Weiterhin wird die Schmelkurvenanalyse zur Beurteilung der Spezifität des qPCR-Assays bei der Verwendung von Farbstoffen wie SYBR Green verwendet. Diese besteht dabei aus einem zusätzlichen Schritt am Ende des qPCR-Laufs. Die Temperatur der Probe wird schrittweise erhöht, während das Gerät weiterhin die Fluoreszenz misst. Mit steigender Temperatur denaturiert die doppelsträngige DNA und wird einzelsträngig, wobei der Farbstoff dissoziiert, was zu einer abnehmenden Fluoreszenz führt. Diese Änderung der Steigung dieser Kurve wird als Funktion der Temperatur aufgetragen, um die Schmelzkurve zu erhalten. Die Schmelztemperatur wird aus der Länge des Fragments und dessen Basenzusammensetzung berechnet (o.A., 2021).

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die molekulare Identifizierung und Resistenztestung des Dermatophyten *Trichophyton indotineae*. Dazu werden 100 Hautschuppen- und Haarwurzel-Proben aus Bangladesch verwendet und analysiert. Dabei erfolgt eine Identifizierung und damit verbundene Genotypisierung durch Sequenzierung der *ITS*-Region. Die Kultivierung erfolgte bereits in einer vorherigen Arbeit. Alle gewachsenen Dermatophyten sollen auf verschiedene Antimykotika getestet werden, um Resistenzen zu untersuchen. Zusammenhänge zwischen DNA und Antimykotika-Resistenz sollen durch Sequenzierung des *SQLE*-Gens erstellt werden. Außerdem werden alle Proben mithilfe eines Resistenz-PCR-Kits auf Mutationen getestet, um zusätzlich nicht gewachsene Proben testen zu können. Durch weitere Gen-Sequenzierung des *Erg11B*-Gens werden Itraconazol-resistente Proben auf Mutationen untersucht.

3 Material

3.1 Organismen

<i>Trichophyton indotineae</i>	600010/21: Terbinafin sensitive Probe aus Routinediagnostik
<i>Trichophyton indotineae</i>	600052/21: Terbinafin resistente Probe aus Routine-diagnostik
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	216377/17: Itraconazol sensitive Probe aus Routine-diagnostik
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	205667/19: Itraconazol resistente Probe aus Routinediagnostik
<i>Trichophyton indotineae</i>	216377/17: Terbinafin high resistente Probe aus Routinediagnostik
<i>Trichophyton indotineae</i>	600010/21: Terbinafin high resistente Probe aus Dubai-Studie
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	218609/20: Terbinafin high sensitive Probe aus Routinediagnostik
Referenzstamm Itraconazol Resistenz mit Mutation	MZ636372.1 <i>Trichophyton mentagrophytes</i> isolate UKJ 594/19 sterol 14-alpha demethylase (Erg11B) gene, partial cds
Referenzstamm Itraconazol Resistenz ohne Mutation	MZ636375.1 <i>Trichophyton mentagrophytes</i> isolate UKJ 476/21 sterol 14-alpha demethylase (Erg11B) gene, partial cds

3.2 Kits und Materialien

DNA-Extraktionskit	Qiagen: Qiaamp [®] DNA Mini Kit (250), LOT No. 172038104
multiplex Real-Time PCR Kit	PathoNostics: DermaGenius [®] Resistance multiplex Real-Time PCR kit, REF PN-303, LOT No. LPN2021076
4-Well-Zellkultur-Platten	SPL Life Sciences, ISO 9001, ISO 13485, ISO 11137
PCR-Streifen	Laborhandel Edelmann: PCR-Streifen 8* 0,2 ml
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf: 1,5 mL Tubes, Katalog-Nr.:0030121023
Abdeckfolie	BIO-RAD: Microseal [®] 'B' seal, Katalog-Nr.: MSB1001, Kontroll-Nr.: B014395
PCR-Platte	Greiner bio-one: Sapphire PCR Microplatte 96 Well, LOT No. 21151
E-Test-Streifen	Liofilchem [™] : MIC Test Strip [™] Itraconazole (ITC) 0,002-32 mg/l, LOT No.: 060420038

3.3 Molekularbiologische Reagenzien

Primer V9D (fwd)	biomers.net: 5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3' 00317768-6
Primer LSU (rev)	biomers.net: 5'-GCATTCCCAAACAACACTCGACTC-3' 00317768-7
nukleasefreies Wasser	Roche: PCR grade water RNA Process Control Kit, 07099592001
Master Mix (5x)	Bio-Budget: myBudget, LOT No. 25FM0510 2,5 mM -MgCl ₂ 400 mM Tris-HCl 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1 % Tween-20 200 μM je dNTP <i>Taq</i> -DNA-Polymerase

Sabouraud Nährmedium (flüssig)	Sifin Diagnostics GmbH, LOT No. 2661006
Glycerol R (wasserfrei)	Dr. K. Hollborn & Söhne, Ph.Eur.: 1040500, CAS-Nr.: 56-81-5, Ch.-B.: IV 21
DSMO	Dr. K. Hollborn & Söhne: Dimethylsulfoxid R (100 ml), Ph.Eur.: 1029500, Ch.-B.:161306580RO
Wasser	Deltamedica: Aqua ad iniectabilia (10 ml), Ch.-B.: 2108768
Terbinafin	Sigma: Terbinafine hydrochloride, LOT No.: SLBV5839
Itraconazol	Sigma: Itraconazole, LOT No.: MKCJ1217
Master Mix (2x)	Biozym: Hs Taq Mix Red, LOT No.: B04562050C Biozym HS <i>Taq</i> DNA Polymerase 6 mM MgCl ₂ 2 mM dNTPs Enhancer Stabilisatoren rote Farbe
SQLE Primer F1 (fwd)	biomers.net: 5'-ATGGTTGTAGAGGCTCCTCCC-3'
SQLE Primer R1 (rev)	biomers.net: 5'-CTAGCTTTGAAGTTCGGCAAA-3'
Primer TmErg11BF3 (fwd)	biomers.net: 5'-GCCACATGATGATTGCTCTTC-3'
Primer Erg11BR1 (rev)	biomers.net: 5'-AATAGTCAGTTGGCGGCACA-3'

3.4 Geräte

Brutschrank 1	memmert, Typ: IN750, DIN12880-2007-Kl.:1
PCR Thermocycler 1	SensoQuest Großer LabCycler ohne Gradienten- funktion mit 96er-Block, Biodeal Handelsvertretung Edelmann e. K., Serien-Nr. 1123320200, Kat.-Nr. GE-TC + GE-B96

Zentrifuge 1	Eppendorf mini spin
Zentrifuge 2	Hettich Zentrifugen: Universal 320
PCR Thermocycler 2	Bio-Rad: CFX96 Real-Time System, C1000 Thermal Cyclers

3.5 Experimentelle Zusammensetzungen

Reaktionsansatz PCR der *ITS*-Region

Tabelle 3.5: Reaktionsansatz durch PCR der *ITS*-Region der Dermatophyten

Reagenz	Endkonzentration	Volumen [μ l]
myBudget Mastermix, 5x	1x	6
Primer V9D, 20 μ M	0,375 μ M	0,75
Primer LSU, 20 μ M	0,375 μ M	0,75
nuklease-freies Wasser	-	16,5
DNA-Lösung	-	6
Gesamt	-	26

Reaktionsansatz PCR des *SQLE*-Gens

Tabelle 3.6: Reaktionsansatz durch PCR des *SQLE*-Gens

Reagenz	Endkonzentration	Volumen [μ l]
Biozym Mastermix, 2x	1x	12,5
Primer F1, 20 μ M	400 nM	0,5
Primer R1, 20 μ M	400 nM	0,5
nuklease-freies Wasser	-	6,5
DNA-Lösung	-	5
Gesamt	-	25

Reaktionsansatz PCR des *Erg11B*-Gens

Tabelle 3.7: Reaktionsansatz durch PCR des *Erg11B*-Gens

Reagenz	Endkonzentration	Volumen [μ l]
Biozym Mastermix, 2x	1x	12,5
Primer TmErg11BF3, 20 μ M	400 nM	0,5
Primer Erg11BR1, 20 μ M	400 nM	0,5
nuklease-freies Wasser	-	6,5
DNA-Lösung	-	5
Gesamt	-	25

4 Methoden

4.1 Kultivierung

Die Kultivierungsmethoden wurden bereits in einer vorherigen Arbeit beschrieben, weswegen diese nicht erneut erwähnt werden. Jedoch spielen die gewonnenen Ergebnisse eine Rolle bei der Auswertung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und sind daher relevant. Die Kultivierung erfolgte über das Ansetzen der Hautschuppen der Patienten zunächst in Mycosel- und Sabouraud-Schrägagarröhrchen und anschließend auf Mycosel- und Sabouraud-Agarplatten.

4.2 Genotypisierung

Alle Proben wurden zur Genotypisierung sequenziert. Dabei wurde die *ITS*-Region der Dermatophyten-DNA analysiert. Zunächst wurde jeweils 1 mm² der gewachsenen Kultur ausgeschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben, welche je mit 200 µl ATL-Lösung des DNA-Extraktionskits der Firma Qiagen gefüllt waren. Es folgte die Isolierung der DNA mit dem Qiacube nach modifiziertem Standardprogramm.

Anschließend wurden alle Reagenzien und Proben gevortext und bis 2000 rpm mit Zentrifuge 1 zentrifugiert. Das Zentrifugieren erfolgte dabei durch Betätigen der Puls-Taste, bis eine Drehzahl von etwa 2000 rpm erreicht wurde. Danach wurde nach folgendem Reaktionsansatz 3.5 der Mastermix erstellt. Es wurde für jede Probe ein Volumen von 24 µl des zusammenpipettierten Mastermixes verwendet. Jeweils 6 µl der extrahierten DNA einer Probe wurden hinzugegeben und durch Pipettieren mit dem Mastermix gemischt. Im Anschluss wurden die PCR-Reaktionsgefäße in den Thermocycler 1 gestellt und folgendes Programm der PCR wurde gestartet.

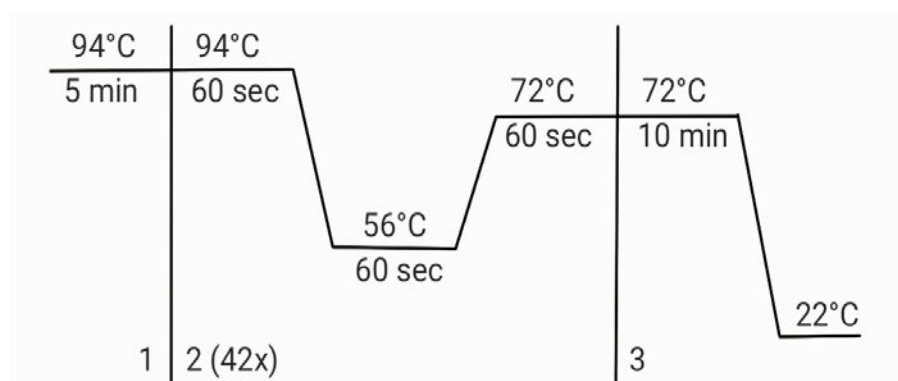


Abbildung 4.1: PCR Programm der Sequenzierung der *ITS*-Region (nach dem my-Budget 5x Mastermix Protokoll)

1 Initiale Denaturierung, 2 Denaturierung, Annealing und Elongation, 3 Finale Elongation

Wie in Abb. 4.1 dargestellt, wurden die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation für 42 Zyklen wiederholt. Dabei erfolgte die Initialdenaturierung für fünf Minuten bei 94 °, die finale Elongation für zehn Minuten bei 72 °C und Lagerung bei Raumtemperatur, welche in dem Fall 22 °C betrug. Nach abgeschlossener PCR wurde die Gesamtmenge von 30 μl in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und an Microsynth SeqLab GmbH versendet, wo die Sequenzierung durchgeführt wurde.

Die Auswertung der sich ergebenden Sequenzen erfolgte durch die Programme Chromas und MEGAX (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Dazu wurden zunächst alle Sequenzen mithilfe des Programms Chromas auf Sequenzierfehler überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Ebenfalls wurden an den Anfängen und Enden Basen entfernt, falls die Basenzuordnung nicht eindeutig war. Danach wurden die Sequenzen im NCBI BLAST eingegeben und mit hinterlegten Sequenzen verglichen, um eine Erregeridentifikation durchzuführen. Ebenfalls wurden die Sequenzen im Alignment Explorer von MEGAX miteinander verglichen, um Unterschiede in den Sequenzen feststellen zu können.

4.3 Resistenztestung

Zur Testung von Resistenzen wurden 4-Well-Zellkultur-Platten verwendet. Jede der 79 Kulturen wurde sowohl auf Terbinafin als auch auf Itraconazol getestet. Für die Testung mit Terbinafin wurden die Konzentrationen 0,1 $\mu\text{l/ml}$, 0,2 $\mu\text{l/ml}$ und 0,5 $\mu\text{l/ml}$ verwendet, für Itraconazol 0,125 $\mu\text{l/ml}$, 0,25 $\mu\text{l/ml}$ und 0,5 $\mu\text{l/ml}$. Es wurden jeweils 80 Platten gegossen.

Zum Gießen der Platten wurde zunächst flüssiger Sabouraud-Agar durch Kochen gelöst. Weiterhin wurden von Terbinafin und Itraconazol jeweils 1:10 Verdünnungen verwendet. Dazu wurden 5 mg Terbinafin mit einem Milliliter DMSO vermengt. Für Itraconazol wurde zunächst eine 1:1 Verdünnung aus 5 mg Itraconazol und 5 ml DMSO erstellt. Für die 1:10 Verdünnung wurden anschließend 80 μl der 1:1 Verdünnung erneut mit 720 μl DMSO vermengt. Anschließend wurden nach folgendem Schema die Medien mit bestimmter Endkonzentration von Terbinafin und Itraconazol erstellt:

Tabelle 4.1: Mischprotokoll für die 1:10 Verdünnungen von Terbinafin und Itraconazol

Terbinafin	0,1 $\mu\text{l/ml}$	0,2 $\mu\text{l/ml}$	0,5 $\mu\text{l/ml}$
Menge Nährboden	80 ml	80 ml	80 ml
Menge Terbinafin	16 μl	32 μl	80 μl
Itraconazol	0,125 μl	0,25 μl	0,5 μl
Menge Nährboden	80 ml	80 ml	80 ml
Menge Itraconazol	100 μl	200 μl	400 μl

Die Medien wurden anschließend durch Invertieren gemischt. In jedes Well wurde dann je circa 800 μl der jeweiligen Konzentration pipettiert. Das obere linke Well jeder Platte wurde mit Nährboden ohne Terbinafin und Itraconazol befüllt.

Um die Resistenzplatten zu testen, wurden Chargenkontrollen mit Terbinafin sensitiven, Terbinafin resistenten, Itraconazol sensitiven und Itraconazol resistenten Stämmen durchgeführt. Während des Aushärtens des Agars wurden Suspensionen jeder Kultur erstellt. Dafür wurden 2,0 ml Reaktionsgefäße mit 1 bis 1,5 ml Wasser gefüllt. Dazu wurde circa ein Quadratzentimeter der Kultur gegeben. Damit sich das Pilzmaterial von dem Nährboden löst, wurden alle Suspensionen gevortext. 50 μ l dieser Kultursuspensionen wurden auf jedes Well aufgetragen. Anschließend wurden alle Platten in Brutschrank 1 bei 28 °C inkubiert. Nach zwei bis vier Tagen wurden die Platten ausgewertet. Isolate, welche eine Terbinafin-Resistenz bis 0,5 μ l/ml zeigten, wurden anschließend auf höhere Terbinafin-Konzentrationen von 8 μ l/ml und 16 μ l/ml getestet. Für diese Konzentrationen wurden 1:1 Verdünnungen von Terbinafin genutzt. Dabei wurden folgendes Mischprotokoll verwendet:

Tabelle 4.2: Mischprotokoll für die 1:10 und 1:1 Verdünnungen von Terbinafin

Terbinafin	0,2 μ l/ml	8 μ l/ml	16 μ l/ml
Menge Nährboden	30 ml	30 ml	30 ml
Menge Terbinafin	12 μ l	48 μ l	96 μ l

Auch bei diesen Konzentrationen wurden Chargenkontrollen mit Stämmen durchgeführt, welche bereits als Terbinafin sensitiv und Terbinafin resistent eingestuft wurden. Nach dem Aushärten des Agars wurden wie bereits beschrieben die Suspensionen auf die Wells der Kulturplatten aufgetragen. Alle Proben wurden in Brutschrank 1 bei 28 °C inkubiert. Die Auswertung fand ebenfalls zwei bis vier Tage später statt.

4.4 Mutationsanalyse der Squalenepoxidase

Zur Analyse von Mutationen im *SQLE*-Gen wurde dieses sequenziert. Dazu wurde die für die vorherige Sequenzierung aus Kapitel 4.2 verwendete isolierte DNA der Dermatophyten genutzt. Dazu wurden die Reagenzien aus Tabelle 3.6 gevortext, mit Zentrifuge 1 bis 2000 rpm nach unten zentrifugiert und anschließend zusammenpipettiert. Für jede Probe wurde ein Volumen von 20 μ l des zusammenpipettierten Mastermixes verwendet. Jeweils 5 μ l der extrahierten DNA jeder Probe wurden hinzugegeben und durch Pipettieren mit dem Mastermix gemischt. Anschließend wurden die PCR-Reaktionsgefäße in den Thermocycler 1 gestellt und folgendes PCR-Programm wurde gestartet.

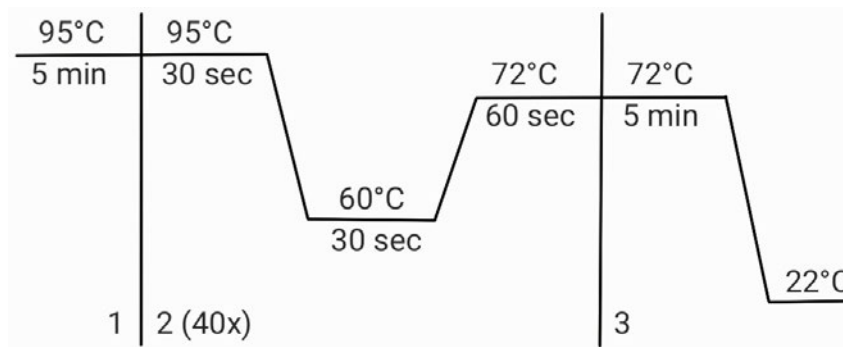


Abbildung 4.2: PCR Programm der Sequenzierung des *SQLÉ*-Gens (nach dem Biozym 2x Red HS Taq Master Mix Protokoll)

1 initiale Denaturierung, 2 Denaturierung, Annealing und Elongation, 3 finale Elongation

Wie in Abbildung 4.2 dargestellt, wurden die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation für 40 Zyklen wiederholt. Dabei erfolgte die Initialdenaturierung für fünf Minuten bei 95°C, die finale Elongation für fünf Minuten bei 72°C und die anschließende Lagerung bei Raumtemperatur, welche in diesem Fall 22°C betrug. Nach abgeschlossener PCR wurde die Gesamtmenge von 25 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und an Microsynth SeqLab GmbH versendet, wo die Sequenzierung durchgeführt wurde. Die Auswertung erfolgte erneut durch die Programme Chromas und MEGAX. Da die Sequenzen rückwärts ausgelesen wurden, wurde von allen Sequenzen zunächst das Reverse Komplement erstellt. Danach wurden alle Sequenzen mit dem Programm Chromas auf Sequenzierfehler überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Es wurden außerdem an den Anfängen und Enden Basen entfernt, falls die Basenzuordnung nicht eindeutig war. Abschließend wurden alle Sequenzen im Alignment Explorer von MEGAX miteinander verglichen, um Mutationen feststellen zu können.

4.5 Mutationsanalyse durch PCR

Neben der Sequenzierung wurde eine Mutationsanalyse aller 99 DNA-Proben aus den reinen Hautschuppen durch Real-Time PCR durchgeführt. Dazu wurde das DermaGenius Resistance Multiplex Real-Time PCR Kit der Firma PathoNostics verwendet. Zunächst wurden alle Reagenzien gemäß dem Kit gemischt.

Alle Proben und Reagenzien wurden vorher gevortext und mit der Zentrifuge 1 bis 2000 rpm nach unten zentrifugiert. Nach dem Mischen der Reagenzien und Zugabe der Proben-DNA wurde die 96-Well-Platte mit einer Abdeckfolie verschlossen und in den Thermocycler 2 gestellt. Das PCR-Programm des Kits wurde danach gestartet. Nach der PCR konnten die C_T -Werte, Schmelztemperaturen und Peak-Werte ausgewertet werden.

4.6 Epsilometer-Test

Für den E-Test (Epsilometer-Test) wurden zunächst neue Suspensionen der Kulturen benötigt. Dafür wurden bisherige Suspensionen oder eingefrorene Kulturen auf Sabouraud-Agar-Platten ausplattiert und für sieben Tage bei 28 °C in Brutschrank 1 inkubiert. Anschließend wurde ein Milliliter Wasser in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Von den Kulturen wurde je ein Quadratzentimeter entnommen und ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Danach wurden alle Suspensionen gevortext. Jeweils 500 μ l der Suspension wurden auf eine Sabouraud-Agar-Platte mittels einer Impföse ausplattiert. Es wurde im Anschluss jeweils ein E-Test-Streifen in die Mitte der Platte gelegt und leicht angedrückt. Die Platten wurden bei 28 °C in Brutschrank 1 für zwei bis drei Tage inkubiert. Anschließend wurden alle Kulturen optisch ausgewertet.

4.7 Mutationsanalyse des *Erg11B*-Gens

4.7.1 Primer-Design

Zunächst wurden die Primer der Veröffentlichung von Burmester, Hipler, Elsner et al. (2022) getestet, um zu untersuchen, ob mit diesen der vermutete Bereich der Mutationen sequenziert werden kann, welcher im Zusammenhang mit einer Azol-Resistenz stehen könnte. Dabei wurden zwei Referenzstämme gewählt, um die Position der Mutationen festzustellen. Der TmErg11BF3-Primer wurde als passend erkannt. Ein passender reverse-Primer war nicht vorhanden. Daher wurde über den NCBI Primer-Blast ein Primer entworfen, welcher folgende Parameter erfüllte: eine minimale Produktlänge von 500 bp, eine maximale Produktlänge von 700 bp, ein Schmelztemperaturminimum von 57 °C, ein Schmelztemperaturoptimum von 60 °C und ein Schmelztemperaturmaximum von 66 °C. Des Weiteren sollte die Schmelztemperatur des reverse-Primers nur 3 °C Unterschied zu dem gegebenen forward-Primer besitzen. Dabei ergab sich unter anderem der selbstbenannte Primer Erg11BR1.

4.7.2 Sequenzierung

Zunächst wurden die gelieferten Primer aus Abschnitt 4.7.1 auf eine Konzentration von 100 μ M mit Wasser verdünnt. Dazu wurden die Primer zuerst mit Zentrifuge 1 bis 2000 rpm nach unten zentrifugiert. Anschließend wurde diese Stammlösung zu einer Arbeitslösung mit einer Konzentration von 20 μ M verdünnt. Dazu wurde die Stammlösung gevortext und mit Zentrifuge 1 bis 2000 rpm nach unten zentrifugiert. Danach wurden 50 μ l dieser Lösung mit 200 μ l Wasser gemischt und erneut gevortext und mit Zentrifuge 1 bis 2000 rpm nach unten zentrifugiert. Anschließend wurden alle Reagenzien ebenfalls gevortext, nach unten zentrifugiert und nach Tabelle 3.7 zusammenpipettiert. Für jede Probe wurde ein Volumen von 20 μ l des zusammenpipettierten Mastermixes verwen-

det. Jeweils 5 μ l der extrahierten DNA aus Kapitel 5.1 jeder Probe wurde hinzugegeben und durch Pipettieren mit dem Mastermix vermischt.

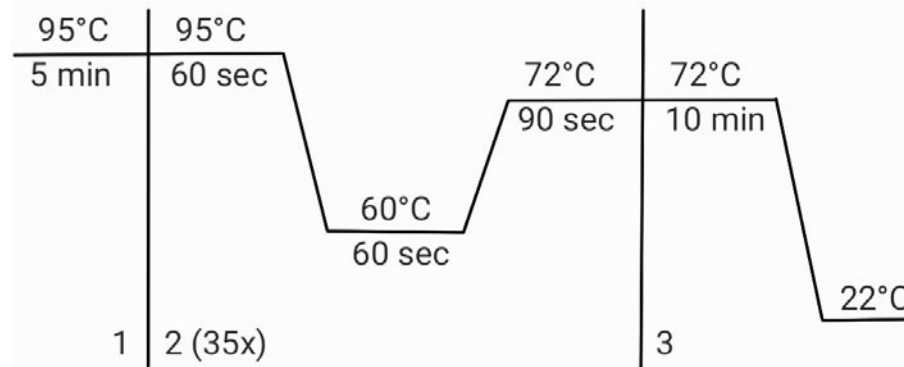


Abbildung 4.3: PCR Programm der Sequenzierung des Erg11B-Gens (nach dem Biozym 2x Red HS Taq Master Mix Protokoll)

1 initiale Denaturierung, 2 Denaturierung, Annealing und Elongation, 3 finale Elongation

Anschließend wurden die PCR-Reaktionsgefäße in den Thermocycler 1 gestellt und folgendes PCR-Programm wurde gestartet. Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, wurden die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation für 35 Zyklen wiederholt. Dabei erfolgte die initiale Denaturierung bei 95°C für fünf Minuten, die finale Elongation bei 72°C für 10 Minuten und die abschließende Lagerung bei 22°C. Die Denaturierung erfolgte für eine Minute bei 95°C, das Primer-Annealing bei 60°C für ebenfalls eine Minute und die Elongation bei 72°C für 90 Sekunden. Nach abgeschlossener PCR wurde die Gesamtmenge von 25 μ l jeder Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Sequenzierung wurde von der Firma Microsynth Seqlab durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte durch die Programme Chromas und MEGAX. Dabei wurden die Sequenzen zunächst überprüft, um zu ermitteln, ob das zu erwartende Produkt gebildet wurde und ob Sequenzierfehler vorlagen. Alle Sequenzen wurden über das Multiple Sequenzalignment des MEGAX Alignment Explorers miteinander verglichen, um Punktmutationen feststellen zu können.

5 Ergebnisse

5.1 Genotypisierung

Für die Sequenzierung wurden die 79 aus Kultur gewonnenen DNA-Proben verwendet. Dabei ergab die Sequenzierung, welche in Tabelle 5.1 zusammengefasst ist, bei 76 Proben, dass es sich um den *T. mentagrophytes* Genotyp VIII (*T. indotineae*) handelt. Ebenso konnten drei Isolate durch Sequenzierung dem Genotyp *T. rubrum* zugeordnet werden. Genauso konnten durch Kultivierung 76 Isolate dem *T. mentagrophytes*-Komplex und drei Isolate *T. rubrum* zugeordnet werden.

Tabelle 5.1: Vergleich der Ergebnisse der Genotypisierung durch Sequenzierung und durch Kultivierung

Method	Dermatophyten-Art	Anzahl (%)	Gesamt (%)
Sequenzierung	<i>Trichophyton indotineae</i>	76 (96,2)	79 (100)
	<i>Trichophyton rubrum</i>	3 (3,8)	
Kultivierung	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	76 (96,2)	79 (100)
	<i>Trichophyton rubrum</i>	3 (3,8)	

Folgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Multiplen Sequenz-Alignment der 79 Sequenzen. Darin ist zu erkennen, dass sich zwei Sequenzen, die im oberen Bereich zu sehen sind, von den anderen unterscheiden. Bei diesen Sequenzen handelt es sich um die *T. rubrum*-Isolate. Alle weiteren Sequenzen weisen keine Unterschiede zueinander auf.

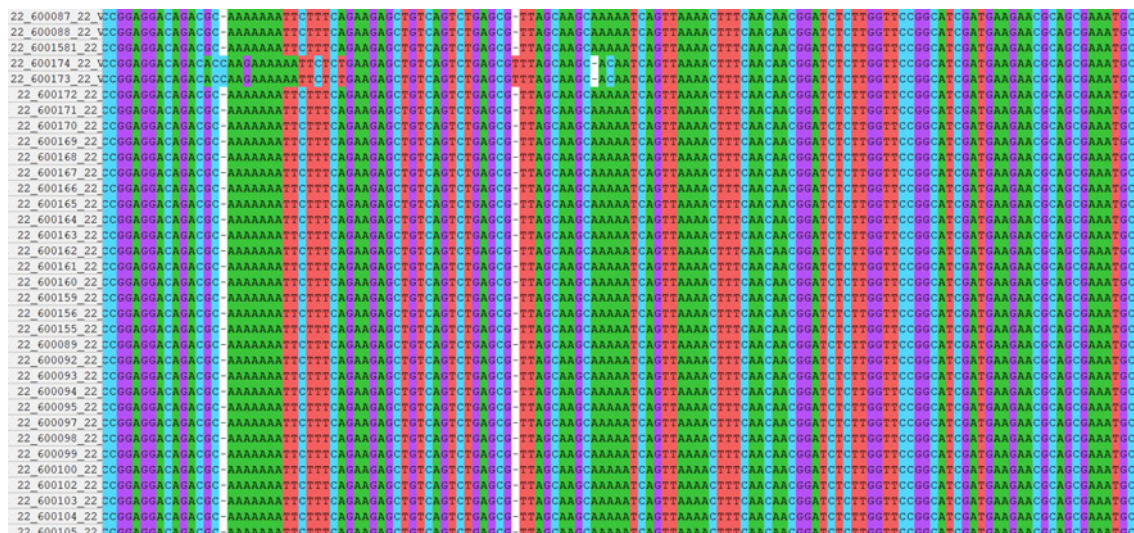


Abbildung 5.1: Ausschnitt des Multiplen Sequenz-Alignment der 79 Sequenzen (Erstellt mit MEGAX)

5.2 Resistenztestung

Alle 79 Isolate wurden auf Terbinafin und Itraconazol getestet, was eine Gesamtzahl von 158 4-Well-Zellkultur-Platten ergibt. Alle Proben zeigten sowohl bei Terbinafin als auch bei Itraconazol eine positive Wachstumskontrolle bei 0,0 $\mu\text{l/ml}$. Tabelle 5.2 zeigt, dass bei 28 Proben bei Terbinafin kein weiteres Wachstum außer bei 0,0 $\mu\text{l/ml}$ auftritt. Zwei Isolate wuchsen bis zu einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{l/ml}$ Terbinafin. Weiterhin gab es bei 23 Proben ein Wachstum bis 0,2 $\mu\text{l/ml}$ und neun Proben bis 0,5 $\mu\text{l/ml}$ Terbinafin. Insgesamt wurden 26 Isolate, welche bis 0,5 $\mu\text{l/ml}$ ein Wachstum zeigten, auf die Terbinafin-Konzentrationen von 8 $\mu\text{l/ml}$ und 16 $\mu\text{l/ml}$ getestet. Dabei zeigte nur eine Probe ein Wachstum bei 8 $\mu\text{l/ml}$. Sechzehn Proben zeigten bei beiden Konzentrationen bis 16 $\mu\text{l/ml}$ ein positives Wachstum. Alle anderen Proben zeigten bei der Testung dieser höheren Konzentrationen immerhin eine positive Wachstumskontrolle bei 0,0 $\mu\text{l/ml}$ und ein Wachstum bei dem Breakpoint bei 0,2 $\mu\text{l/ml}$.

Bei Itraconazol zeigten 56 von 79 Isolaten kein weiteres Wachstum über 0,0 $\mu\text{l/ml}$. Eine Probe wuchs bis zu einer Konzentration von 0,125 $\mu\text{l/ml}$. Alle weiteren Proben zeigten ein Wachstum bei 0,25 $\mu\text{l/ml}$ bis einschließlich 0,5 $\mu\text{l/ml}$.

Tabelle 5.2: Ergebnisse der Resistenztestung auf Terbinafin und Itraconazol

Terbinafin [$\mu\text{l/ml}$]	Anzahl (%)	Itraconazol [$\mu\text{l/ml}$]	Anzahl (%)
0,0	28 (35,4)	0,0	56 (70,9)
0,1	2 (2,5)	0,125	1 (1,3)
0,2	23 (29,1)	0,25	0 (0,0)
0,5	9 (11,4)	0,5	22 (27,8)
8	1 (1,3)	Gesamt	79 (100)
16	16 (20,3)		
Gesamt	79 (100)		

Wie in Tabelle 5.3 dargestellt, zeigten 49 (62,1 %) der auf Terbinafin getesteten Proben ein Wachstum über dem Breakpoint von 0,2 $\mu\text{l/ml}$ und wurden als resistent gewertet. Die verbleibenden 37,6 % (30 Proben) konnten als sensibel gewertet werden. Jedoch wurden von diesen 30 Proben zwei Proben als gehemmt eingestuft, da diese immerhin ein Wachstum bis 0,1 $\mu\text{l/ml}$ zeigten. Daher fielen nur 28 Proben in die Kategorie „sensibel“. Im Gegensatz dazu erwiesen sich 22 (27,85 %) Proben bei Itraconazol als resistent, während 57 (72,15 %) sensibel auf das Antimykotikum reagierten. Von diesen 57 Isolaten konnte eine Probe als gehemmt eingestuft werden, die ein Wachstum bis 0,125 $\mu\text{l/ml}$ zeigte.

Tabelle 5.3: Differenzierung zwischen resistenten, sensiblen und gehemmten Stämmen in Bezug auf Terbinafin und Itraconazol

	resistent (%)	sensibel (%)	gehemmt (%)	Gesamt (%)
Terbinafin	49 (62,1)	28 (35,4)	2 (2,5)	79 (100)
Itraconazol	22 (27,8)	56 (70,9)	1 (1,3)	79 (100)

Tabelle 5.4 stellt die Ergebnisse der Resistenztestung auf Terbinafin und Itraconazol gegenüber. Dabei ist zu erkennen, dass 20 Isolate sowohl auf Terbinafin als auch auf Itraconazol sensibel reagierten. Wiederum waren 12 Proben bei beiden Antimykotika resistent. Damit waren von insgesamt 49 Terbinafin-resistenten Isolaten 37 Itraconazol-sensibel. Genauso waren von 22 Itraconazol-resistenten Proben 10 Terbinafin-sensibel.

Tabelle 5.4: Zusammenhang zwischen der Terbinafin und Itraconazol-Resistenz

	Terbinafin sensibel	Terbinafin resistent	Gesamt
Itraconazol sensibel (%)	20 (25,3)	37 (46,8)	57 (72,2)
Itraconazol resistent (%)	10 (12,7)	12 (15,2)	22 (27,8)
Gesamt (%)	30 (38,0)	49 (62,0)	79 (100)

Die nachfolgenden Bilder zeigen die abzulesenden Ergebnisse bei resistenten und sensiblen Proben. Zum Vergleich wurde dabei eine Probe ausgewählt, welche auf Terbinafin und Itraconazol resistent reagierte, eine Probe, welche nur auf Terbinafin resistent reagierte und eine Probe, welche keine Resistenz gegenüber einem der beiden Antimykotika zeigt.

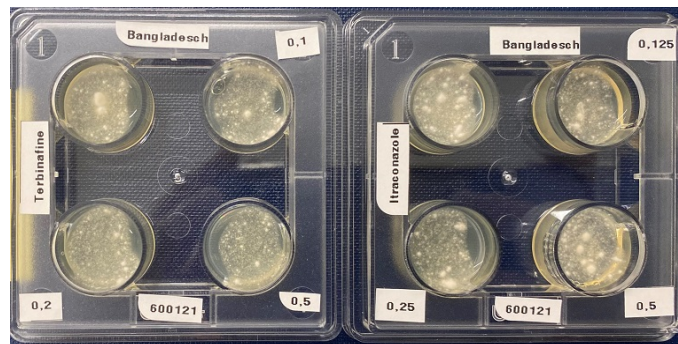


Abbildung 5.2: Probe Nr. 47

Links: Testung auf Terbinafin mit dem Ergebnis „resistent“, rechts: Testung auf Itraconazol mit dem Ergebnis „resistent“

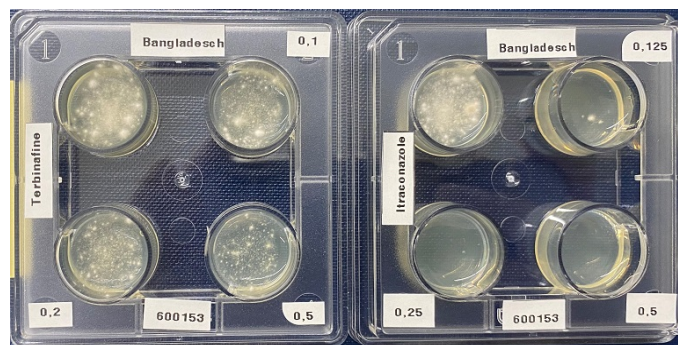


Abbildung 5.3: Probe Nr. 59

Links: Testung auf Terbinafin mit dem Ergebnis „resistent“, rechts: Testung auf Itraconazol mit dem Ergebnis „sensibel“

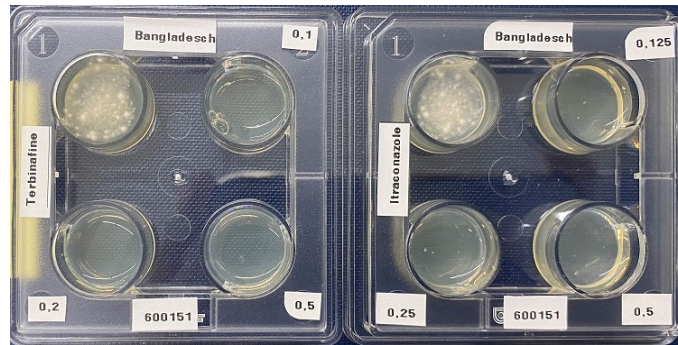


Abbildung 5.4: Probe Nr. 77

Links: Testung auf Terbinafin mit dem Ergebnis „sensibel“, rechts: Testung auf Itraconazol mit dem Ergebnis „sensibel“

5.3 Epsilometer-Test

Nach zwei bis drei Tagen Bebrütung wurden alle Proben auf Hemmhöfe untersucht. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse, welche in Tabelle 5.5 dargestellt sind.

Tabelle 5.5: Ergebnisse des Epsilometer-Test von 22 untersuchten Proben im Vergleich zu dem Breakpoint-Test bei 0,5 µl/ml

+++ : starkes Wachstum, ++ : deutlich sichtbares Wachstum, + : leichtes Wachstum, (+) : schwaches Wachstum

Itraconazol-Konzentration [mg/l]	Anzahl	Prozent	Breakpoint-Test
0,25	1	4,5	+++
0,38	2	9,1	++
			(+)
0,5	5	22,7	+++
	2	9,1	(+)
0,75	1	4,5	+++
1	4	18,2	+++
	2	9,1	++
1,5	2	9,1	+++
2	2	9,1	+++
32	1	4,5	+++
Gesamt	22	100	

Bei einer Probe konnte ein Hemmhof beginnend bei einer Itraconazol-Konzentration von 0,25 mg/l erkannt werden. Zwei Proben zeigten eine Resistenz bis 0,38 mg/l, sieben Proben bis 0,5 mg/l und eine Probe bis 0,75 mg/l. Bis 1 mg/l zeigten sechs Proben ein resistentes Wachstum und bis 1,5 mg/l war dieses bei zwei Proben zu beobachten. Weiterhin zeigten zwei Proben bis 2 mg/l eine Resistenz. Eine einzige Probe zeigte ein vollständiges Plattenwachstum und damit eine vollständige Resistenz auf Itraconazol. Dieses ist in Abbildung 5.7 dargestellt. In den Abbildungen 5.5 und 5.6 sind Platten abgebildet, welche die Auswertung der Hemmhöfe der Proben darstellen. Dabei besitzt Probe Nummer 14 eine Resistenz bis 0,5 mg/l und Probe Nummer 57 bis 0,75 mg/l.

Abbildung 5.5: Vorder- und Rückseite der E-Test-Kultur der Probe Nummer 14
Resistenz bis 0,5 mg/l

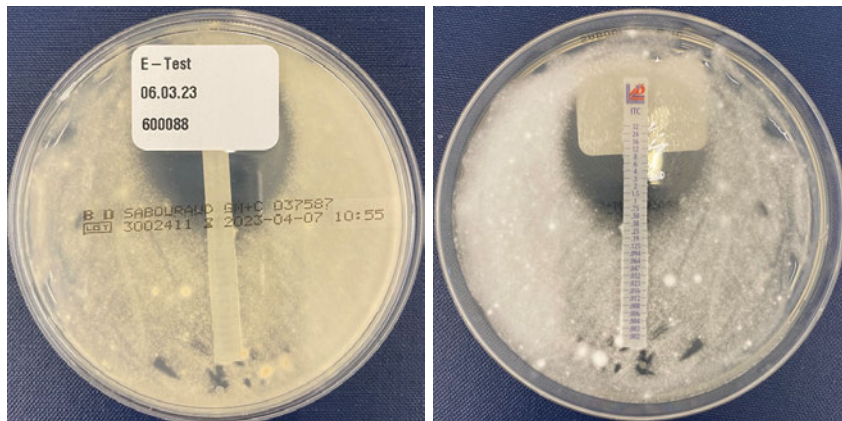


Abbildung 5.6: Vorder- und Rückseite der E-Test-Kultur der Probe Nummer 57
Resistenz bis 0,75 mg/l

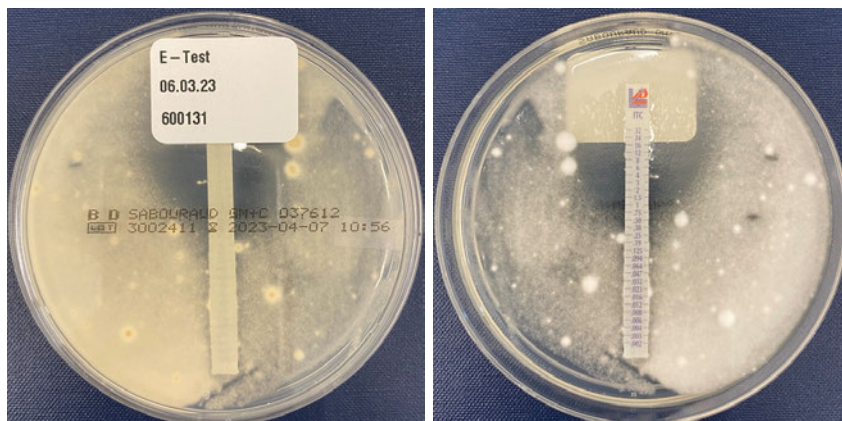
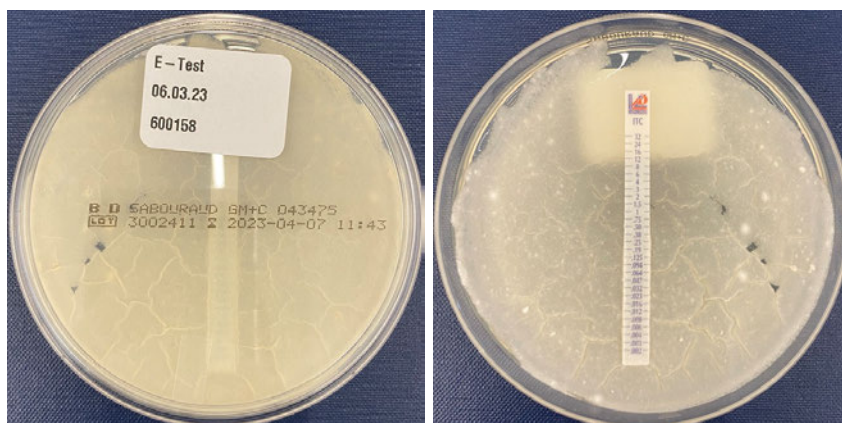


Abbildung 5.7: Vorder- und Rückseite der E-Test-Kultur der Probe Nummer 84
Resistenz über 32 mg/l



Im Vergleich zu der Breakpoint-Empfindlichkeitstestung ist zu erkennen, dass Isolate bis zu einer Konzentration von 0,5 mg/l bei der Breakpoint-Testung in insgesamt drei Fällen lediglich ein schwaches Wachstum zeigten, welches dazu führte, dass diese Proben als resistent gewertet wurden. Alle Proben, welche ab einer Konzentration von über

einem Milligramm pro Liter ein Wachstum zeigten, wuchsen ebenfalls deutlich bei dem Breakpoint-Test.

5.4 Mutationsanalyse der Squalenepoxidase

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte über das Multiple Sequenzalignment. Das nachfolgende Bild zeigt Ausschnitte dieses Alignments. Darin sind die Punktmutationen zu erkennen, welche zu verschiedenen Proteinaustauschen an den Positionen 393, 397, 429, 436 und 448 führten.

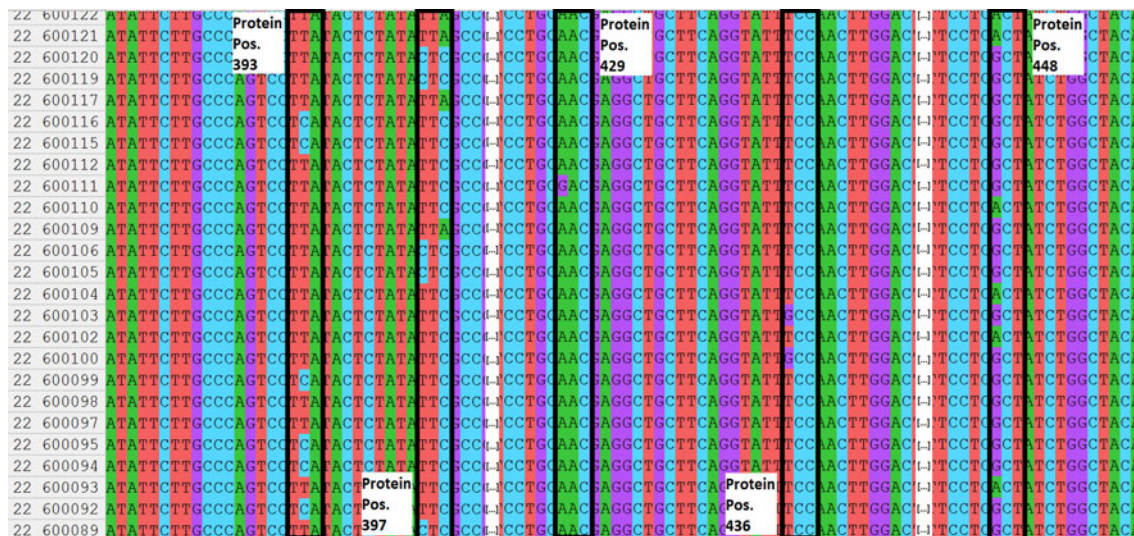


Abbildung 5.8: Ausschnitte des Multiplen Sequenzalignments zur Identifizierung von Mutationen im *SQLE*-Gen an den Protein-Positionen 393, 397, 429, 436 und 448 (Erstellt mit MEGAX und bearbeitet mit Paint)

Die Sequenzierung des *SQLE*-Gens zeigte demnach verschiedene Punktmutationen. Dabei ist, wie in Tabelle 5.6 gezeigt, die Mutation Phe³⁹⁷Leu (F397L) mit 33,8 % am häufigsten vertreten. Bei dieser gibt es drei verschiedene Punktmutationen, welche diesen Aminosäureaustausch verursachen. Hierbei gab es in neun Proben den Basenaustausch von TTC zu TTA, in 14 Proben den Austausch von TTC zu CTC und einmal den Austausch von TTC zu TTG.

Danach folgen Leu³⁹³Ser (L393S) von TTA zu TCA mit 28,2 % und Ala⁴⁴⁸Thr (A448T) von GCT zu ACT mit 26,8 %. Ausnahmen dieser Studie bilden Ser⁴³⁶Ala (S436A) von TCC zu GCC mit 7,0 % und Leu³⁹³Phe (L393F) von TTA zu TTC, Phe³⁹⁷Ile (F397I) von TTC zu ATC und Asn⁴²⁹Asp (N429D) von AAC zu GAC mit jeweils 1,4 %.

Tabelle 5.6: Ergebnisse der Mutationsanalyse durch Sequenzierung

Mutation	Basenaustausch im <i>SQLE</i> Gen	Anzahl	Prozent (%)	Gesamt (%)
L393S	TTA → TCA	20	28,2	20 (28,2)
L393F	TTA → TTC	1	1,4	1 (1,4)

Ergebnisse der Mutationsanalyse durch Sequenzierung (*Fortsetzung*)

Mutation	Basenaustausch im <i>SQL</i> E Gen	Anzahl	Prozent (%)	Gesamt (%)
F397L	TTC → TTA	9	12,7	24 (33,8)
	TTC → CTC	14	19,7	
	TTC → TTG	1	1,4	
F397I	TTC → ATC	1	1,4	1 (1,4)
S436A	TCC → GCC	5	7,0	5 (7,0)
N429D	AAC → GAC	1	1,4	1 (1,4)
A448T	GCT → ACT	19	26,8	19 (26,8)
Gesamt		71	100	71 (100)

Folgende Tabelle 5.7 stellt die Mutationen bezogen auf die Gesamtprobenzahl dar. Dabei wird dargestellt, dass 71 Mutationen (89,9 %) festgestellt werden konnten. Davon enthalten drei Isolate zwei Mutationen. Daraus ergibt sich, dass bei 86,1 % aller Isolate eine oder zwei Mutationen identifiziert werden konnten. Die verbleibenden 11 Isolate (13,9 %) weisen keine Mutationen auf.

Tabelle 5.7: Zusammenfassung der Mutationen bezogen auf die Gesamtanzahl der Isolate

	Anzahl	Prozent
Anzahl Mutationen	71	89,9
- Isolate mit zwei Mutationen	3	3,8
Isolate mit Mutation/-en	68	86,1
+ Isolate ohne Mutationen	11	13,9
Gesamt Isolate	79	100

Zur Veranschaulichung der Zusammenhänge zwischen Mutationen und Resistenzen, wurden diese Ergebnisse gegenüber gestellt. Dabei ergaben sich folgende Werte in Tabelle 5.8.

Tabelle 5.8: Zusammenhang zwischen der Terbinafin- und Itraconazol-Resistenz und Punktmutationen

	Terbinafin resistent u. Itraconazol resistent	Terbinafin resistent u. Itraconazol sensibel	Terbinafin sensibel u. Itraconazol resistent	Terbinafin sensibel u. Itraconazol sensibel	Gesamt
L393S	2	18	0	0	20
L393F	0	1	0	0	1
F397L	7	17	0	0	24
F397I	0	1	0	0	1
S436A	2	0	0	3	5
N429D	0	0	0	1	1

Zusammenhang zwischen der Terbinafin- und Itraconazol-Resistenz und Punktmutationen
(Fortsetzung)

	Terbinafin resistent u. Itraconazol resistent	Terbinafin resistent u. Itraconazol sensibel	Terbinafin sensibel u. Itraconazol resistent	Terbinafin sensibel u. Itraconazol sensibel	Gesamt
A448T	4	0	9	6	19
Mutationen Gesamt	15	37	9	16	71
-	0	0	1	10	11
Gesamt	15	37	10	26	82

Anhand dieser Ergebnisse kann erkannt werden, dass in den Proben, welche sowohl auf Terbinafin als auch auf Itraconazol resistent reagierten, 15 Mutationen festgestellt werden konnten. Dabei besitzen zwei Isolate die Mutation Leu³⁹³Ser, sieben Isolate besitzen Phe³⁹⁷Leu, weitere zwei Isolate die Mutation Ser⁴³⁶Ala und vier Isolate die Mutation Ala⁴⁴⁸Thr. Bei der Resistenztestung mittels 4-Well-Platten ergab sich eine Anzahl von 12 Isolaten, welche bei beiden Antimykotika resistent wirkten. Diese Anzahl von 15 Mutationen durch Sequenzierung ergibt sich daraus, dass es sich hierbei u.a. um die drei in Tabelle 5.7 genannten Isoalte mit zwei Mutationen, je einmal Phe³⁹⁷Leu und einmal Ala⁴⁴⁸Thr, in dem *SQLE*-Gen handelt.

Terbinafin-resistente, aber Itraconazol-sensible Proben, zeigen in 18 Fällen die Mutation Leu³⁹³Ser, einmal Leu³⁹³Phe, in 17 Fällen Phe³⁹⁷Leu und einmal Phe³⁹⁷Ile. Neun von zehn Isolaten, die eine Resistenz bei Itraconazol, aber nicht bei Terbinafin aufwiesen, besitzen die Mutation Ala⁴⁴⁸Thr. Die zehnte dieser Proben zeigt keine Mutation. Zuletzt weisen auch auf beide Antimykotika sensibel reagierende Isolate in 16 von 26 Fällen Mutationen auf. Dabei kam die Mutation Leu³⁹³Ser in sechs Isolaten vor, die Mutation Ser⁴³⁶Ala in drei Isolaten, die Mutation Asn⁴²⁹Asp in einem Isolat und die Mutation Ala⁴⁴⁸Thr in sechs Isolaten. Die verbleibenden zehn Proben weisen keine Mutationen auf.

5.5 Mutationsanalyse durch PCR

Die Auswertung des DermaGenius Resistance Kits erfolgte über die Messung der C_T -Werte, Schmelztemperaturen und Peakhöhen. Nach diesen Werten wurde die Auswertung der Proben vorgenommen. Dabei ergaben sich die Ergebnisse, die in Tabelle 5.9 zusammengefasst dargestellt sind. Darin ist zu erkennen, dass es sich von 99 untersuchten Proben bei 61 Proben um einen Mutanten handelt. Die restlichen 38 Proben wurden als Wildtyp identifiziert. Bei den als Wildtyp identifizierten Proben wurden 34 Erreger dem *T. interdigitale*/*T. mentagrophytes*-Komplex zugeordnet und die verbleibenden vier Erreger zu *T. rubrum*. Bei allen als Mutant identifizierten Proben handelt es sich um einen Erreger des *T. interdigitale*/*T. mentagrophytes*-Komplexes. Dabei stimmt

die Erregeridentifikation mit den Ergebnissen des PCR-ELISA einer vorherigen Arbeit überein.

Tabelle 5.9: Ergebnisse der Resistenztestung mittels DermaGenius Resistance Kit

	Mutationsidentifikation (%)	Erregeridentifikation (%)	
		<i>T. interdigitale</i> / <i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
Wildtyp	38 (38,4)	34 (34,3)	4 (4,1)
Mutant	61 (61,6)	61 (61,6)	0 (0,0)
Gesamt	99 (100)	95 (95,9)	4 (4,1)

Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 5.9 den Unterschied bei der Erregeridentifikation zwischen *T. rubrum*, dessen Schmelzkurven-Peak in orange dargestellt ist, und *T. interdigitale*/*T. mentagrophytes*, dessen Schmelzkurven-Peaks in grün dargestellt sind. Weiterhin sind in blau die Kurven dargestellt, durch welche das Vorhandensein von Mutationen bestimmt wird.

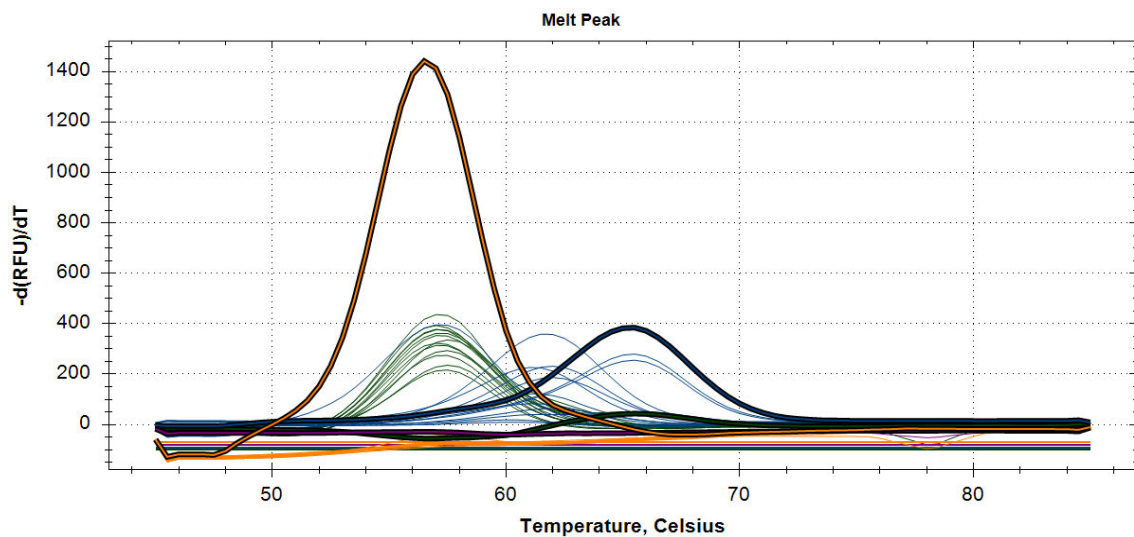


Abbildung 5.9: Schmelzkurvenwerte durch die multiplex Real-Time PCR
Verdeutlichung der Auswertung der Erregeridentifikation

Zum Vergleich dieser Ergebnisse mit der Resistenztestung und der Mutationsanalyse durch Sequenzierung, wurden alle Ergebnisse in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 5.10: Zusammenhängende Darstellung der PCR-, Sequenzierungs- und Kulturergebnisse der Resistenz- und Mutationsanalyse

PCR (Anzahl)	Sequenzierung Mutationen (Anzahl)	Kultur		
		Terbinafin	Itraconazol	Anzahl
Mutant (64) - 3 Doppel- mutationen	L393S (20)	resistent	resistent	2
		resistent	sensibel	18
	L393F (1)	resistent	sensibel	1

Zusammenhängende Darstellung der PCR-, Sequenzierungs- und Kulturergebnisse der Resistenz- und Mutationsanalyse (Fortsetzung)

PCR (Anzahl)	Sequenzierung Mutationen (Anzahl)	Kultur		
		Terbinafin	Itraconazol	Anzahl
Mutant (64) - 3 Doppel- mutationen	F397L (24)	resistent	resistent	7
		resistent	sensibel	17
	F397I (1)	resistent	sensibel	1
	A448T (3)	resistent	resistent	3
davon ohne Kultur (14)	-	-	-	-
Wildtyp (38)	A448T (16)	resistent	resistent	1
		sensibel	resistent	9
		sensibel	sensibel	6
	S436A (5)	resistent	resistent	2
		sensibel	sensibel	3
	N429D (1)	sensibel	sensibel	1
	Ohne Mutation (11)	sensibel	resistent	1
sensibel		sensibel	10	
davon ohne Kultur (6)	-	-	-	-
102 -3 = 99	82 -3 = 79			82 -3 = 79

In dieser Tabelle ist zu erkennen, dass Proben, welche durch das PCR Resistance Kit als Mutant identifiziert wurden, die Mutationen Leu³⁹³Ser, Leu³⁹³Phe, Phe³⁹⁷Leu, Phe³⁹⁷Ile, und Ala⁴⁴⁸Thr enthalten. 14 weitere Proben konnten durch die PCR der DNA aus Hautschuppen als Mutanten identifiziert, allerdings nicht sequenziert werden, da kein Kulturwachstum vorlag.

Zwanzig Proben enthalten die Mutation Leu³⁹³Ser. Dabei zeigte die Resistenztestung, dass zwei Isolate bei sowohl Terbinafin als auch Itraconazol resistent reagierten. Achtzehn Isolate mit dieser Mutation reagierten lediglich bei Terbinafin resistent. Eine Probe enthielt an dieser Position einen anderen Basenaustausch, welcher zu der Mutation Leu³⁹³Phe führte. Diese Probe zeigte nur bei Terbinafin eine Resistenz.

An der Proteinposition 397 traten zwei Punktmutationen in 25 Proben auf. Davon kam in einer Probe die Mutation Phe³⁹⁷Ile vor und bei den restlichen 24 Proben die Mutation Phe³⁹⁷Leu. Das Isolat mit der Phe³⁹⁷Ile-Mutation wies eine Resistenz bei Terbinafin, aber nicht bei Itraconazol auf. Die Phe³⁹⁷Leu-Mutanten zeigten in allen 24 Fällen eine Terbinafin-Resistenz und in sieben dieser Fälle ebenfalls eine Itraconazol-Resistenz.

Die verbleibenden drei Proben zeigten eine Mutation an Position 448 von Alanin zu Threonin. Diese Isolate zeigten bei beiden Antimykotika eine Resistenz, aber auch eine weitere Mutation an Position 397 von Phenylalanin zu Leucin. Dadurch kommen 64 Mutationen in 61 Mutanten vor.

Achtunddreißig DNA-Proben konnten durch die PCR als Wildtyp identifiziert werden. Sechzehn dieser Proben enthalten die Mutation Ala⁴⁴⁸Thr, wobei diese in einem Isolat vorkommt, welches auf beide Antimykotika resistent reagierte. Weitere neun Proben

reagierten lediglich bei Itraconazol resistent und sechs Proben zeigten kein Wachstum bei Zugabe eines Antimykotikums. Bei fünf Proben, von welchen zwei eine doppelte Resistenz zeigten und drei Proben keine Resistenz, konnte in der Sequenzierung die Mutation Ser⁴³⁶Ala festgestellt werden. Eine weitere Probe, welche keine Resistenz aufwies, besitzt die Mutation Asn⁴²⁹Asp. Elf Isolate zeigten in der Sequenzierung keine Mutationen. Jedoch konnte bei einer dieser Proben eine Itraconazol-Resistenz festgestellt werden. Da bei den restlichen sechs Proben kein Wachstum erfolgte, konnte weder eine Sequenzierung noch die Resistenztestung vorgenommen werden. Insgesamt konnten 99 Proben durch PCR und 79 Proben durch Resistenztestung und Sequenzierung untersucht werden, wobei, wie bereits erwähnt, drei Proben zwei Mutationen enthalten.

5.6 Sequenzierung des Erg11B-Gens

Die Auswertung dieser Sequenzen erfolgte erneut über das Multiple Sequenzalignment. Dabei waren Punktmutationen zu erkennen, welche zu unterschiedlichen Proteinaustauschen an den Positionen 441, 443, 444 und 445 führten.

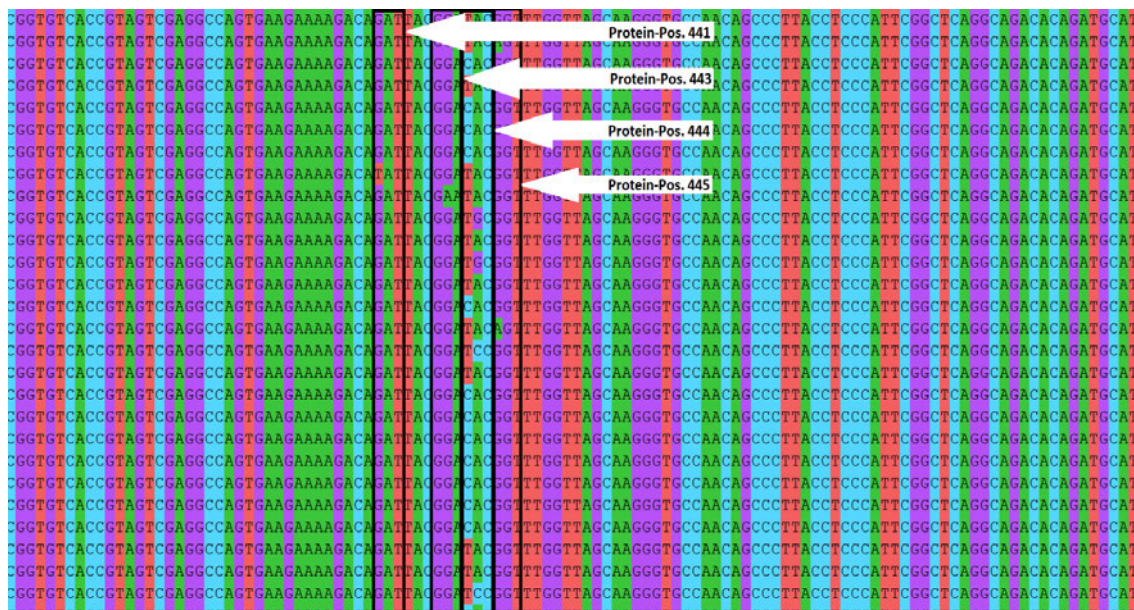


Abbildung 5.10: Ausschnitt des Multiplen Sequenzalignments zur Identifizierung von Mutationen im *Erg11B*-Gen an den Protein-Positionen 441, 443, 444 und 445 (Erstellt mit MEGAX und bearbeitet mit Paint)

Wie in der Abbildung zu sehen ist, konnten an den vier Positionen, welche Mutationen aufwiesen, verschiedene Basenaustausche aufgefunden werden. In Tabelle 5.11 sind diese Austausche dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass an Position 441 zwei unterschiedliche Austausche stattfanden. Bei vier Proben konnte der Austausch Asp⁴⁴¹Tyr (D441T) und bei einer Probe der Austausch Asp⁴⁴¹Gly (D441G) festgestellt werden. Bei zwei Isolaten wurde an Position 443 die Mutation Gly⁴⁴³Glu (G443E) und bei einem weiteren die Mutation Gly⁴⁴³Arg (G443R) detektiert. Die größte Anzahl an Mutatio-

nen befindet sich an Position 444. Hierbei wurden die meisten Mutationen als Tyr⁴⁴⁴His (T444H) identifiziert. Dreißig Proben enthielten diese Mutation. Weiterhin konnte bei fünf Proben der Basenaustausch Tyr⁴⁴⁴Cys (T444C) und bei vier Proben der Basenaustausch Tyr⁴⁴⁴Ser (T444S) festgestellt werden. Mit circa 76% hat dieser Bereich den größten Anteil an untersuchten Mutationen. An Position 445 waren zwei Punktmutationen zu verzeichnen. Drei Isolate enthielten die Mutation Gly⁴⁴⁵Ser (G445S) und ein Isolat den Austausch Gly⁴⁴⁵Asp (G445D). Damit wurden insgesamt 51 Punktmutationen durch diese Analyse identifiziert, was 65% aller getesteten Proben ausmacht.

Tabelle 5.11: Ergebnisse der Mutationsanalyse durch Sequenzierung des *Erg11B*-Gens bezogen auf Isolate mit Mutationen

Mutation	Basenaustausch im <i>Erg11</i> -Gen	Anzahl	Prozent
D441T	GAT → TAT	4	7,8
D441G	GAT → GGT	1	2,0
G443E	GGA → GAA	2	3,9
G443R	GGA → AGA	1	2,0
T444H	TAC → CAC	30	58,8
T444C	TAC → TGC	5	9,8
T444S	TAC → TCC	4	7,8
G445S	GGT → AGT	3	5,9
G445D	GGT → GAT	1	2,0
Gesamt		51	100

Um die Zusammenhänge zwischen Mutationen des *Erg11B*-Gens und Resistenzen gegenüber Itraconazol herstellen zu können, sind in Tabelle 5.12 diese Daten zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 5.12: Zusammenhang zwischen Punktmutationen des *Erg11B*-Gens mit der Resistenz gegenüber Itraconazol bezogen auf alle untersuchten Proben

Mutation	Itraconazol-Testung	Anzahl	Prozent
D441T	sensibel	4	5,0
D441G	sensibel	1	1,3
G443E	resistent	1	1,3
	sensibel	1	1,3
G443R	sensibel	1	1,3
T444H	resistent	2	2,5
	sensibel	28	35,4
T444C	resistent	2	2,5
	sensibel	3	3,8
T444S	sensibel	4	5,1
G445S	resistent	2	2,5
	sensibel	1	1,3
G445D	sensibel	1	1,3
Mutationen Gesamt		51	64,6

Zusammenhang zwischen Punktmutationen des *Erg11B*-Gens mit der Resistenz gegenüber Itraconazol bezogen auf alle untersuchten Proben (*Fortsetzung*)

Mutation	Itraconazol-Testung	Anzahl	Prozent
keine	resistent	15	19,0
	sensibel	13	16,4
Gesamt		79	100

An diesen Ergebnissen kann gezeigt werden, dass sieben Proben, welche bei der Breakpoint-Testung auf Itraconazol resistent reagierten, ebenfalls eine Mutation aufweisen. Bei diesen Mutationen handelt es sich zunächst um Gly⁴⁴³Glu. Eine Probe mit dieser Mutation weist ebenfalls eine Resistenz gegenüber dem Antimykotikum auf. Weiterhin besitzen zwei Itraconazol-resistente Proben die Mutation Tyr⁴⁴⁴His und weitere zwei Proben den Basenaustausch Tyr⁴⁴⁴Cys. Die letzten Itraconazol-resistenten Proben zeigen die Mutation Gly⁴⁴⁵Ser. Damit besitzen 14% der Proben, welche eine Mutation aufweisen, ebenfalls die Resistenz gegenüber Itraconazol. Fünfzehn Proben, welche keine Mutationen in dem *Erg11B*-Gen aufweisen, reagierten auf Itraconazol in der Breakpoint-Testung resistent. Außerdem besitzen 13 Isolate keine Resistenz und weisen des Weiteren keine Mutation in besagtem Gen auf.

Zusammenfassend für den Vergleich der Resistenz und Mutationen stellt die folgende Tabelle alle 79 Proben in Bezug auf Resistenz und Vorhandensein einer Mutation des *Erg11B*-Gens dar.

Tabelle 5.13: Zusammenfassung der Zusammenhänge zwischen Resistenz und Mutationen des *Erg11B*-Gens bezogen auf alle untersuchten Proben

	Mutation vorhanden (%)	Mutation nicht vorhanden (%)	Gesamt (%)
Itraconazol resistent	7 (8,9)	15 (19,0)	22 (27,9)
Itraconazol sensibel	44 (55,7)	13 (16,4)	57 (72,1)
Gesamt	51 (64,6)	28 (35,4)	79 (100)

Durch diese Tabelle wird dargestellt, dass sieben Isolate sowohl eine Resistenz als auch eine Mutation aufweisen. Dreizehn Proben besitzen weder eine Itraconazol-Resistenz noch eine Mutation. Fünfzehn Proben weisen eine Resistenz gegenüber Itraconazol auf, jedoch keine Mutationen. Weiterhin zeigten 44 Proben keine Resistenz, allerdings waren Mutationen im *Erg11B*-Gen zu finden. Damit konnten 51 Proben als Mutanten, 28 Proben als Nicht-Mutanten, 22 Proben als resistent und 57 Proben als sensibel eingeordnet werden.

Ein letzter Vergleichspunkt ist die Mutation Ala⁴⁴⁸Tyr des *SQLE*-Gens, da diese ebenfalls mit der Itraconazol-Resistenz in Verbindung gebracht werden kann. Demnach stellt die folgende Tabelle den Vergleich zwischen Mutationen des *Erg11B*-Gens mit der Ala⁴⁴⁸Tyr Mutation des *SQLE*-Gens dar.

Tabelle 5.14: Vergleich der Mutationen des *Erg11B*-Gens mit der Ala⁴⁴⁸Tyr Mutation des *SQLE*-Gens bezogen auf alle untersuchten Proben

Mutation <i>Erg11B</i>	Ala ⁴⁴⁸ Tyr (<i>SQLE</i>)	Anzahl	Prozent
D441T	nicht vorhanden	4	5,1
D441G	nicht vorhanden	1	1,3
G443E	nicht vorhanden	2	2,5
G443R	nicht vorhanden	1	1,3
T444H	nicht vorhanden	30	37,8
T444C	nicht vorhanden	5	6,3
T444S	nicht vorhanden	4	5,1
G445S	nicht vorhanden	3	3,8
G445D	vorhanden	1	1,3
keine	vorhanden	18	22,8
	nicht vorhanden	10	12,7
Gesamt		79	100

Bei 51 Proben, welche in dem *Erg11B*-Gen eine Mutation besitzen, weist lediglich eine dieser Proben ebenfalls die Mutation Ala⁴⁴⁸Tyr in dem *SQLE*-Gen auf. Von 19 Isolaten mit dieser Mutation, weisen demnach 18 Proben keine Mutation im *Erg11B*-Gen auf. Von den Proben, welche in der Analyse des *Erg11B*-Gens keine Mutationen zeigten, besitzen 18 Proben jedoch die Mutation Ala⁴⁴⁸Tyr. Die verbleibenden zehn Isolate besitzen weder eine Mutation in dem *Erg11B*-Gens noch die Mutation Ala⁴⁴⁸Tyr des *SQLE*-Gens.

6 Diskussion

6.1 Erregerbestimmung

Die Erregerbestimmung bzw. Genotypisierung erfolgte durch die Sequenzierung der *ITS*-Region der Dermatophyten-DNA. Dabei wurden die Sequenzen über den NCBI Blast identifiziert. Alle 76 als *T. mentagrophytes* identifizierten Proben konnten eindeutig dem Genotyp VIII zugeordnet werden. Da in den gegebenen Proben nur zwei verschiedene *Trichophyton*-Arten enthalten waren, fiel die morphologische Auswertung nicht schwer. Trotz morphologischer Unterscheidungen konnten alle Proben durch Kultivierung richtig identifiziert werden. Drei von 79 Isolaten wurden dabei durch optische Besonderheiten, wie beispielsweise der rotbraunen Kolonierückseite, der Dermatophyten-Art *T. rubrum* zugeordnet. Auch diese Identifikation konnte durch die Sequenzierung bestätigt werden.

Sowohl die morphologische Analyse als auch die Sequenzierung erwiesen sich damit als geeignete Methoden zur Identifizierung der Erreger. Die Sequenzierung ist durch genauere Analysen jedoch besser zur Genotypisierung geeignet.

6.2 Resistenztestung

Da Dermatophyten zunehmend Resistenzen gegenüber verschiedenen Antimykotika entwickeln, wurde im Verlauf dieser Studie eine Resistenztestung durchgeführt. Diese kann als erfolgreich gewertet werden, da unterschiedliche Resistenzwerte festgestellt werden konnten. Bei den beiden getesteten Antimykotika handelte es sich um Terbinafin und Itraconazol. Dabei zeigte sich, dass 62% der auf Terbinafin getesteten Stämme resistent reagierten. Dies ist damit zu begründen, dass Terbinafin zunächst das Mittel der Wahl darstellt und oft verschrieben wird. Auch bei wiederkehrenden Dermatomykosen wird erneut Terbinafin verwendet, was nach längerer Anwendung zu einer Resistenz des jeweiligen Dermatophyten führt. Im asiatischen Raum werden häufig Kombinationspräparate verwendet, welche ein stark wirksames topisches Glukokortikoid und mehrere antimikrobielle Wirkstoffe enthalten. Überwiegend enthalten diese sogenannten Combo Creams oder Cocktail Creams Clobetasolpropionat, ein topisches Glukokortikoid der Klasse IV. Ein Grund für die Verbreitung und Langzeitanwendung der Kombinationspräparate ist der Preis, welcher deutlich unter dem von topischen antimykotischen Monopräparaten liegt. Außerdem sind die Combo Creams ohne ärztliche Verschreibung verfügbar und werden in Apotheken OTC empfohlen und verkauft. Terbinafin hat gerade bei indischen Stämmen von *Trichophyton indotineae* bei chronisch rezidierenden Dermatomykosen weder topisch noch systemisch appliziert eine Wirkung. Dabei besteht überwiegend eine In-vitro-Resistenz gegenüber Terbinafin (Nenoff und Uhrlaß, 2022). Weiterhin zeigten immerhin 35% aller getesteten Stämme ein sensibles Wachstum. Bei

diesen Infektionen kann demnach mit Terbinafin behandelt werden. 2,5% der Isolate entwickelten keine Resistenz. Dabei wurde der Breakpoint von $0,2 \mu\text{l/ml}$ zwar noch nicht erreicht, jedoch war bei diesen Proben ein Wachstum bei $0,1 \mu\text{l/ml}$ zu beobachten. In diese Fällen kann mit Terbinafin behandelt werden, allerdings sollten auch alternative Behandlungsmethoden in Betracht gezogen werden.

Als zweites Antimykotikum wurde Itraconazol, aus der Gruppe der Azole, getestet. Dabei zeigte sich, dass nur circa 27% aller Proben resistent auf dieses Medikament wirkten. Der Großteil mit 72% reagierte hierbei sensibel. Weiterhin wurde nur eine Probe als gehemmt eingestuft. Bei Itraconazol kann allerdings, im Gegensatz zu Terbinafin, kein direkter Breakpoint ermittelt werden, um einen Stamm als resistent einzustufen. Dabei wurde sich bei dieser Auswertung auf die Einstufung von Terbinafin bezogen. Ob ein Isolat daher ab einer Konzentration von $0,25 \mu\text{l/ml}$ als resistent gewertet werden kann, kann nicht genau gesagt werden. Aus diesem Grund wurde nachfolgend der Epsilometer-Test durchgeführt, um anhand eines größeren Konzentrationsspektrums die Resistenzen der Dermatophyten auf Itraconazol untersuchen zu können. Dabei zeigte sich zunächst, dass die untersuchten Proben zwar als resistent gewertet wurden, jedoch in drei Fällen ein sehr schwaches Wachstum zeigten. Bei einer dieser Proben, welche bis zu einer Konzentration von $0,5 \mu\text{l/ml}$ ein schwaches Wachstum aufwies, konnte das Ergebnis einer Resistenz bis zu dieser Konzentration durch den Epsilometer-Test nicht bestätigt werden. Dabei war ein Hemmhof ab $0,38 \text{ mg/l}$ zu erkennen. Bei den anderen beiden Isolaten konnte die Resistenz bis $0,5 \mu\text{l/ml}$ bestätigt werden. Eine weitere Probe, welche bei dem Breakpoint-Test eine Resistenz bis $0,5 \mu\text{l/ml}$ zeigte, ergab einen Hemmhof ab $0,25 \text{ mg/l}$ bei dem E-Test. Bei weiteren zwei Proben konnte die Resistenz bis $0,5 \mu\text{l/ml}$ nicht durch den E-Test bestätigt werden. Dabei handelte es sich um Resistenzen bis $0,38 \text{ mg/l}$. Bei den verbliebenen 11 Isolaten stellte sich heraus, dass die Resistenzen über 1 mg/l hinausgingen. Dabei stellte Probe Nr. 84, welche bisher durch außergewöhnliches Wachstum auffiel, erneut eine Besonderheit dar, da diese keine Hemmung gegenüber Itraconazol aufzeigte.

Zusammengefasst ergab sich, dass 12 Isolate sowohl bei Terbinafin als auch bei Itraconazol resistent reagierten. Nur 25% aller getesteten Proben reagierten auf beide Antimykotika sensibel, was den Einsatz von Breitband-Antimykotika und den sogenannten Combo Creams nachweist, denn 47 Stämme wiesen bei mindestens einem von beiden Antimykotika eine Resistenz auf.

6.3 Terbinafin-Resistenz durch Mutationen der Squalenepoxidase

Laut Yamada, Maeda et al. (2017) stehen Mutationen des *SQLE*-Gens im direkten Zusammenhang mit Resistenzen gegenüber Terbinafin. Daher wurde eine Mutationsanalyse durch Sequenzierung durchgeführt, um diese Mutationen zu ermitteln. Dabei stellte sich heraus, dass 68 Proben von insgesamt 79 getesteten Isolaten Mutationen in die-

sem Gen aufweisen. Jedoch zeigten nur 49 Isolate ebenfalls eine Resistenz gegenüber Terbinafin.

Die Mutationsanalyse erfolgte ebenfalls durch das DermaGenius Resistance Kit der Firma Qiagen. Dabei werden allerdings nur die Mutationspositionen 393 und 397 beachtet. Dadurch konnten alle Proben als Mutanten identifiziert werden, welche Mutationen an diesen Positionen enthielten. Bei diesen handelte es sich um Leu³⁹³Ser, Leu³⁹³Phe, Phe³⁹⁷Leu und Phe³⁹⁷Ile. Dass die Mutation Ala⁴⁴⁸Thr detektiert wurde, kann in drei von vier Fällen dadurch erklärt werden, dass es sich bei diesen Proben um die erwähnten Doppelmutationen handelte, welche ebenfalls eine Phe³⁹⁷Leu-Mutation besitzen, die durch die PCR erkannt wurden. Bei der vierten Probe war unklar, weshalb diese als Mutant identifiziert wurde. Deshalb wurde die Testung wiederholt. Dabei ergab sich als neues Ergebnis das Resultat „Wildtyp“, wodurch das vorherige Ergebnis nicht in der Zusammenfassung der Ergebnisse erwähnt wurde. Wie es dabei zu dem aufkommenden Fehler kam, konnte nicht geklärt werden. Damit wurden 46 der Terbinafin-resistenten Proben durch sowohl die multiplex Real-Time PCR als auch die Sequenzierung als Mutanten identifiziert, indem sie Punktmutationen an den Positionen 393 und 397 aufweisen. Die Mutation Ala⁴⁴⁸Thr hat dabei keinen Einfluss auf die Resistenz gegenüber Terbinafin. Diese ist dafür bekannt, die Wahrscheinlichkeit einer Itraconazol-Resistenz zu erhöhen (Burmester, Hipler, Uhrlaß et al., 2020).

Die übrigen drei Terbinafin-resistenten Isoalate zeigten die Mutationen Ala⁴⁴⁸Thr und Ser⁴³⁶Ala. Bei dem sowohl Terbinafin- als auch Itraconazol-resistenten Stamm, welcher lediglich die Mutation Ala⁴⁴⁸Thr aufweist, handelt es sich um die Probe Nummer 84. Diese präsentierte sich in der Kultivierung, als auch Resistenztestung und nun auch in der Mutationsanalyse als außergewöhnlich. Eine Begründung für die Terbinafin-Resistenz, ohne dass eine Mutation vorliegt, kann nicht gegeben werden. Die verbleibenden 15 Isolate mit dieser Mutation zeigten in neun Fällen eine Itraconazol-Resistenz und in sechs Fällen eine sensible Reaktion auf das Antimykotikum. Diese Ergebnisse unterstützen die Aussage, dass die Mutation eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Itraconazol-Resistenz hervorrufen kann, was jedoch nicht zu einer Resistenz führen muss. Bei den letzten beiden Terbinafin-resistenten Proben mit der Ser⁴³⁶Ala-Mutation kann davon ausgegangen werden, dass diese Mutation zu einer Resistenz führen kann, dies aber nicht zwingend der Fall sein muss. Die drei sensiblen Proben beweisen, dass die Mutation nicht in jedem Fall eine Resistenz auslöst. Die letzte Mutation Asn⁴²⁹Asp ist eine Mutation, welche für keine Resistenz verantwortlich ist.

Bei der Sequenzierungsanalyse der Isolate ohne Mutationen waren keine Resistenzen zu erwarten. Bei 91% dieser Proben ist dies eingetreten. Eine Probe zeigte dennoch eine Itraconazol-Resistenz. Da diese nicht durch eine Mutation der Squalenepoxidase verursacht wird, ist auch dieses Ergebnis passend zu den Erwartungen.

Bei allen weiteren Proben, welche durch fehlende Kulturen nicht sequenziert werden konnten, war ein Vergleich und eine Auswertung der Ergebnisse des Resistenz-Kits mit den spezifischen Punktmutationen nicht möglich.

Bei dem Vergleich aller Ergebnisse war auffällig, dass einige Ergebnisse der Resistenz und Mutationen nicht übereinstimmten. Das bedeutet bei Proben, bei welchen durch

das Vorhandensein einer Mutation eine Terbinafin-Resistenz erwartet wurde, keine Resistenz beobachtet werden konnte. Daher wurden diese Proben in der Resistenztestung wiederholt, wobei sich neue Ergebnisse ergaben. Proben, welche vorher als „sensibel“ eingestuft wurden, zeigten bei erneuter Testung eine Resistenz. Dies könnte damit erklärt werden, dass bei dem Erstellen des Agars mit bestimmten Konzentrationen an Terbinafin eine zu hohe Menge dieses Antimykotikums verwendet wurde, wodurch die Dermatophyten kein Wachstum zeigen konnten. Bei erneuter Testung mit den korrekten Konzentrationen, konnte die Resistenz der jeweiligen Dermatophyten richtig abgelesen werden.

Für die Sequenzierung aller getesteten Gene wurde DNA aus Kulturen verwendet, um die reine DNA der Dermatophyten zu erhalten und untersuchen zu können. Die Hautschuppen der Patienten enthielten zudem auch Schimmel- und Hefepilze, was in der vorherigen Arbeit bereits diskutiert wurden, weshalb sich eine Sequenzierung aus dieser DNA nicht anbietet. Die DNA aus den Hautschuppen konnte allerdings für das DermaGenius Resistance Kit mittels PCR verwendet werden, da dort spezifische Bereiche der Dermatophyten-DNA identifiziert und analysiert werden.

6.4 Itraconazol-Resistenz durch Mutationen des *ERG11*-Gens

Die angewendete Methode selbst erwies sich als erfolgreich. Die eigenerstellten Primer sowie PCR-Programm lieferten zu erwartende Sequenzen. Lediglich fünf Sequenzen mussten bei dieser Methode durch Fehler bei der Sequenzierung wiederholt werden. Allerdings musste die Konzentration der PCR-Produkte angepasst werden, da diese zu hoch war. Dazu wurden diese Produkte vor dem Versand an Microsynth SeqLab 1:1 mit 25 μ l nukleasefreiem Wasser verdünnt.

Ausgangspunkt für diese Analyse stellte die Veröffentlichung von Burmester, Hipler, Elsner et al. (2022) dar. Hintergrund war dabei, dass vermehrt Stämme von *T. indotineae* auftreten, welche zusätzlich zu der Terbinafin-Resistenz ebenfalls eine Azol-Resistenz aufweisen. Dazu wurden Mutationen des *Erg11B*-Gens der Lanosterol 14-Alpha-Demethylase identifiziert, da dieses Gen ein Enzym codiert, welches mit Azolen interagiert. In dieser Veröffentlichung wurde jedoch bereits beschrieben, dass ein genauer Zusammenhang zwischen Mutationen dieses Gens und der Azol-Resistenz damit noch nicht bewiesen ist.

Gleichermaßen der Ergebnisse von Burmester, Hipler, Elsner et al. (2022) wurden durch die Analyse des *Erg11B*-Gens vier Proteinpositionen identifiziert, welche Mutationen enthalten. Dabei wurden in 79 untersuchten Proben insgesamt 51 Mutationen festgestellt. Um den besagten Zusammenhang herstellen zu können, wurden die Ergebnisse dieser Analyse mit der Resistenztestung auf Itraconazol verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass lediglich sieben Itraconazol-resistente Proben eine Mutation aufwiesen. Bei den restlichen 15 von insgesamt 22 Itraconazol-resistenten Isolaten konnten kei-

ne Mutationen festgestellt werden. Allerdings besitzt der Großteil mit 56% aller getesteten Proben zwar keine Resistenz gegenüber Itraconazol, jedoch Mutationen. Sollte daher ein Zusammenhang bestehen, dass Mutationen dieses Gens dazu führen, dass ein Stamm eine Resistenz gegenüber Azolen entwickelt, kann dieser durch die hier erzielten Ergebnisse nicht nachgewiesen werden. Nur 25% der Proben würden diesem Fall entsprechen. In der Studie von Bhattacharyya et al. (2023) wurde ebenfalls das *Erg11*-Gen auf Mutationen untersucht. Dabei wurde die gefundene Gly⁴⁴³Glu-Mutation als nicht relevant für die Resistenzentwicklung erachtet.

Durch die Mutationsanalyse des *SQLA*-Gens wurde die Mutation Ala⁴⁴⁸Tyr identifiziert. Diese ist wie bereits erwähnt für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Ausbildung der Azol-Resistenz verantwortlich (Bhattacharyya et al., 2023). Dies konnte größtenteils durch die Analyse aus Abschnitt 5.4 bestätigt werden. Durch die Auswertung der Mutationen des *Erg11B*-Gens konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Auch in diesem Vergleichspunkt stimmen die Ergebnisse der Analysen nicht überein, was zusätzlich dafür spricht, dass kein direkter Zusammenhang zwischen einer Azol-Resistenz und einer Mutation in diesem Gen besteht. Nur eine einzige Probe weist sowohl eine Ala⁴⁴⁸Tyr-Mutation als auch eine Gly⁴⁴⁵Asp-Mutation auf. Allerdings reagierte dieses Isolat auf Itraconazol sensibel. Damit gibt es keine übereinstimmenden Ergebnisse, welche die These des Zusammenhangs belegen können.

Die hohe Häufigkeit von *Erg11B*-Mutationen von *T. indotineae* zeigt, dass der Erwerb einer Azol-Resistenz ein unterschätztes Problem bei der Behandlung von Hautpilzen zu sein scheint. Die einzigartigen Genotypen der einzelnen Isolate deuten darauf hin, dass sich die resistenten Stämme unabhängig voneinander zu verschiedenen Zeitpunkten entwickelt haben. Die Herausforderung für die künftige Diagnostik besteht daher darin, nicht nur die Spezies-Subtypen zu bestimmen, sondern auch Gene zu analysieren, welche am Resistenzmechanismus beteiligt sind (Burmester, Hipler, Elsner et al., 2022).

7 Ausblick

Zunächst können alle angewandten Methoden als erfolgreich gewertet werden, da jede dieser Methoden Ergebnisse erzielte. Jedoch entsprachen einige Ergebnisse nicht den Erwartungen. Durch fehlende Übermittlung der klinischen Daten aus Bangladesch, konnte keine Auswertung dieser Daten erfolgen. Ebenso konnten die erzielten Ergebnisse nicht auf Alter, Geschlecht und Art der Erkrankung bezogen werden, was weiter-schauend in Betracht gezogen werden sollte.

In Bezug auf die Resistenztestung könnten im weiteren Verlauf ebenfalls weitere Azol-Antimykotika getestet werden, da bei diesen genauso ein Zusammenhang zu den untersuchten Genen bestehen könnte. Durch klinische Informationen kann ebenso eine genauere Untersuchung, abhängig von dem Ort der Infektion, vorgenommen werden. Die für den Infektionsort typischen Antimykotika können demnach spezifisch für jeden Patienten getestet und ausgewertet werden, um einen möglichst genauen Therapieansatz bieten zu können.

Bei der Mutationsanalyse des *Erg11B*-Gens kann in weiteren Schritten eine komplette Sequenzierung dieses Gens durch weitere Primer erfolgen, da bisher nur etwa 700 bp dieses Gens ausgewertet wurden. Dabei kann beispielsweise die durch Burmester, Hipler, Elsner et al. (2022) beschriebene Mutation Ala²³⁰Thr untersucht werden.

Des Weiteren kann eine Genom-Sequenzierung jedes Stammes vorgenommen werden. Dabei können die Isolate auf Tandem-Repeats des *CYP51B*-Gens untersucht werden. Die Überexpression dieses Gens soll laut Yamada, Yaguchi et al. (2022) die Wahrscheinlichkeit einer Resistenz gegenüber Itraconazol erhöhen bzw. im direkten Zusammenhang mit dieser stehen. Durch mehrere Kopien dieses Gens, welche zu einer kompensatorischen Überexpression der Effluxpumpen führen, kann es zu einer langsameren Reaktion der Azole kommen (Bhattacharyya et al., 2023).

8 Zusammenfassung

Für die molekulare Identifizierung und Resistenztestung mittels Breakpoint-Methode und Punktmutationsanalyse der Squalenepoxidase sowie Lanosterol 14-Alpha-Demethylase des Dermatophyten *Trichophyton indotineae* wurden 100 Patienten-Proben in Form von Hautschuppen und Haarwurzeln verwendet. Die mikroskopische und morphologische Analyse sowie PCR-ELISA-Testung wurde in einer vorherigen Arbeit beschrieben und ausgewertet. In Erweiterung wurden nun 79 aus Kultur gewonnene DNA-Proben durch Sequenzierung der ITS-Region analysiert. Dabei konnten 76 Isolate dem Stamm *T. indotineae* und drei Isolate dem Stamm *T. rubrum* zugeordnet werden, was mit der morphologischen Auswertung übereinstimmte.

Es folgte die Resistenztestung der Proben auf Terbinafin und Itraconazol. Dabei konnten bei Terbinafin 49 Proben als resistent, 28 Proben als sensibel und zwei Proben als gehemmt gewertet werden. Bei Itraconazol wurden 22 Proben als resistent, 56 Proben als sensibel und eine Probe als gehemmt gewertet. Es traten dabei bei 12 Isolaten Doppel-Resistenzen auf. Auch zeigten 20 Proben bei keinem der beiden Antimykotika eine Resistenz. Da die Itraconazol-Testung im Gegensatz zu Terbinafin keinen direkten Breakpoint besitzt, wurden die Itraconazol-resistenten Proben ebenfalls durch den Epsilon-Test untersucht. Dabei konnten die bisherigen Ergebnisse überwiegend bestätigt werden. Eine Probe zeigte dabei eine Resistenz bis 32 mg/l, was nicht den Erwartungen entsprach, da die restlichen Proben eine Resistenz bis maximal 2 mg/l aufwiesen. Die Resistenzentwicklung hängt dabei mit dem Einsatz dieser Antimykotika zusammen, da Terbinafin oft präventiv und oft wiederholt verschrieben wird. Des Weiteren kommen Breitspektrum-Antimykotika und Combo Creams zum Einsatz, welche OTC empfohlen und verkauft werden.

Durch die Mutationsanalyse der Squalenepoxidase konnten 71 Mutationen identifiziert werden. Da bei drei Proben Doppel-Mutationen auftraten, konnten in 68 Isolaten eine oder zwei Mutationen festgestellt werden. Es kamen dabei in doppelt resistenten Stämmen 15 Mutationen, in nur Terbinafin resistenten Proben 37 Mutationen, in nur Itraconazol resistenten Proben 9 Mutationen und schlussendlich in doppelt sensiblen Proben 16 Mutationen vor. Diese Ergebnisse sollten durch die Mutationsanalyse durch PCR belegt werden. Dabei wurden die 99 Hautschuppen-Proben in Wildtyp und Mutant unterschieden. Achtunddreißig Proben konnten als Wildtyp und 61 Proben als Mutanten identifiziert werden. Es konnten dabei nur Proben als Mutant identifiziert werden, welche die Mutationen an den Positionen 393 oder 397 besitzen. Es wurden zusätzlich Proben als Mutanten identifiziert, welche die Ala⁴⁴⁸Tyr-Mutation besitzen. Bei diesen handelte es sich allerdings um die Proben, welche zwei Mutationen besitzen, was erklärt, weshalb diese als Mutant deklariert wurden. Von 20 Proben, bei welchen es zu keinem positiven Kulturwachstum kam, konnten 14 als Mutanten und sechs als Wildtyp identifiziert werden. Dies konnte nicht durch Sequenzierung bestätigt werden, da keine Kultur vorhanden war, um DNA zu entnehmen. Die Analyse aller Proben erfolgte

durch das DermaGenius Resistance Kit aus den reinen Hautschuppen. Im Vergleich dieser Analyse mit der Resistenztestung zeigte sich, dass Proben, welche als Mutanten deklariert wurden ebenfalls eine Terbinafin-Resistenz aufwiesen. Drei weitere Proben, welche als Wildtyp identifiziert wurden, zeigten eine Terbinafin-Resistenz. Zwei dieser besitzen die Mutation Ser⁴³⁶Ala und eine die Mutation Ala⁴⁴⁸Tyr. Durch diese Mutationsanalyse konnte bestätigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Mutationen des *SQLE*-Gens und Antimykotika-Resistenzen besteht. Neben den Positionen 393 und 397 könnte nun auch die Position 436 in Betracht gezogen werden, da diese in zwei Fällen eine Resistenz auslöste.

Zuletzt erfolgte die Mutationsanalyse des *Erg11B*-Gens, welches im Zusammenhang mit der Azol-Resistenz stehen soll. Dabei wurden vier Positionen erkannt, in welchen verschiedene Punktmutationen stattfanden. Bei dieser Analyse konnten 51 Mutationen festgestellt werden. Sieben Proben, welche eine Mutation enthalten, wiesen zudem eine Resistenz gegenüber Itraconazol auf. Fünfzehn Proben zeigten eine Itraconazol-Resistenz, jedoch keine Mutation. Bei dem Vergleich der *Erg11B*-Mutationen mit der Ala⁴⁴⁸Tyr-Mutation fiel auf, dass lediglich eine Probe beides enthielt. Durch diese Ergebnisse konnte ein Zusammenhang zwischen einer Azol-Resistenz und Mutationen in dem *Erg11B*-Gen nicht bestätigt werden.

Für den weiteren Verlauf könnten die klinischen Daten der Patienten in Betracht gezogen werden, um Alter, Geschlecht und Art der Erkrankungen auswerten zu können. Weiterhin können diese dazu beitragen, auf Patienten abgestimmte Therapieansätze zu erstellen. Außerdem kann eine Genomsequenzierung der Proben vorgenommen werden, um Tandem-Repeats des *CYP51B*-Gens zu untersuchen, da die Überexpression dieses Gens für Azol-Resistenzen verantwortlich sein kann.

Literatur

- Aaron, D (2023) Leistenflechte (Tinea inguinalis). *MSD Manual - Ausgabe für Patienten*.
- Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology, EC for und ID (ESCMID) (2000) Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection* 6(9):S. 509–515.
- Arnemann, J (2019). Multiplex-PCR. In: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer, S. 1698–1698.
- BgVV (2001) Problematik der Entwicklung von Resistenzen humaner Mykosen gegenüber Azol-Antimykotika und eventueller Wechselwirkungen mit den als Fungizid eingesetzten Pflanzenschutzmitteln. *Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin*.
- Bhattacharyya, A, S Sadhasivam, M Sinha, S Gupta, S Saini, H Singh, A Khurana, S Sachdeva, K Sardana und S Ghosh (2023) Treatment of recalcitrant cases of tinea corporis/cruris caused by *T. mentagrophytes*–interdigitale complex with mutations in ERG11 ERG 3, ERG4, MDR1 MFS genes & SQLE and their potential implications. *International Journal of Dermatology*.
- bioscience, G. (2019) *Einfluss von ROX auf den Ct-Wert*. URL: <https://www.genaxxon.com/blog/einfluss-von-rox-auf-den-ct-wert> (aufgerufen am 09.03.2023).
- Biosystems, A. (o.A.) *Essentials of Real Time PCR*. URL: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/nucleic-acid-amplification-expression-profiling/pdfs.par.65119.file.dat/essentials%5C%20of%5C%20real%5C%20time%5C%20pcr.pdf> (aufgerufen am 08.03.2023).
- Bonifaz, A, T Ramírez-Tamayo und A Saúl (2003) Tinea barbae (tinea sycosis): experience with nine cases. *The Journal of dermatology* 30(12):S. 898–903.
- Brasch, J, Y Gräser, V Beck-Jendroscheck, K Voss, K Torz, G Walther und T Schwarz (2021) „Indische“ *Trichophyton mentagrophytes*-Stämme mit reduzierter Itraconazol-Empfindlichkeit in Deutschland: “Indian” strains of *Trichophyton mentagrophytes* with reduced itraconazole-susceptibility in Germany. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 19(12):S. 1723–1728.
- Burmester, A, UC Hipler, P Elsner und C Wiegand (2022) Point mutations in the squalene epoxidase erg1 and sterol 14- α demethylase erg11 gene of *T. indotineae* isolates indicate that the resistant mutant strains evolved independently. *Mycoses* 65(1):S. 97–102.
- Burmester, A, UC Hipler, S Uhrlaß, P Nenoff, A Singal, SB Verma, P Elsner und C Wiegand (2020) Indian *Trichophyton mentagrophytes* squalene epoxidase erg1 double mutants show high proportion of combined fluconazole and terbinafine resistance. *Mycoses* 63(11):S. 1175–1180.

- Dr. Walliczek-Dworschak, U. (2019) *Dermatomykosen*. URL: <https://www.gelbe-liste.de/krankheiten/dermatomykosen> (aufgerufen am 06. 02. 2023).
- Hawkins, SF und PC Guest (2017) Multiplex analyses using real-time quantitative PCR. *Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications* S. 125–133.
- Heidemann, S, M Monod und Y Gräser (2010) Signature polymorphisms in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic and anthropophilic strains of *Trichophyton interdigitale* and other species of *T. mentagrophytes sensu lato*. *British Journal of Dermatology* 162(2):S. 282–295.
- Heller-Vitouch, C Behandlung von Mykosen.
- Höck, M (2012). Dermatophyten. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, S. 617–623.
- Hoog, GS de, K Dukik, M Monod, A Packeu, D Stubbe, M Hendrickx, C Kupsch, JB Stielow, J Freeke, M Göker et al. (2017) Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia* 182(1):S. 5–31.
- IQWiG. (o.A.) *Resistenz*. URL: <https://www.gesundheitsinformation.de/glossar/resistenz.html> (aufgerufen am 02. 03. 2023).
- Kano, R, U Kimura, M Kakurai, J Hiruma, H Kamata, Y Suga und K Harada (2020) *Trichophyton indotineae* sp. nov.: a new highly terbinafine-resistant anthropophilic dermatophyte species. *Mycopathologia* 185(6):S. 947–958.
- Klonowski, E und Nenoff (o.A.) *Trichophyton indotineae* Kano 2021 (*Trichophyton mentagrophytes* ITS Genotyp VIII Nenoff, Verma Uhrlaß 2019). *Pilzgalerie*.
- Klonowski, E und Nenoff (o.A.) *Trichophyton rubrum* Sabouraud 1911. *Pilzgalerie*.
- Kolb-Mäurer, A und O Kurzai (2020) Dermatophyten. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* S. 845–851.
- Konrad, R und U Busch (2010) PCR und Real-time PCR. *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: Grundlegende Methoden und Anwendungen* S. 35–47.
- Kurzai, O und OA Cornely (2020). Antimykotika. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiolo*. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 1009–1016.
- Lares, E (2000) Dermatomykosen: Über 80 Prozent Heilungsrate mit Clotrimazol. *Arzneimittel und Therapie* (23):S.20.
- Lin, RL, JC Szepietowski und RA Schwartz (2004) *Tinea faciei*, an often deceptive facial eruption. *International journal of dermatology* 43(6):S. 437–440.
- Marroki, A und L Bousmaha-Marroki (2022) Antibiotic resistance diagnostic methods for pathogenic bacteria.
- Mayser, P, P Nenoff, D Reinel, D Abeck, J Brasch, G Daeschlein, I Effendy, G Ginter-Hanselmayer, Y Gräser, UC Hipler et al. (2020) S1 guidelines: *Tinea capitis*. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 18(2):S. 161–179.
- Miksits, K und H Hahn (1999). Pilze. In: *Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, S. 209–228.
- Monod, M, M Feuermann und T Yamada (2021). Terbinafine and itraconazole resistance in dermatophytes. In: *Dermatophytes and Dermatophytoses*. Springer, S. 415–429.
- Mülhardt, C (2013) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Springer.

- Müller, HJ und DR Prange (2016) PCR-Polymerase-Kettenreaktion. Springer.
- Nenoff et al. (2022) S1-Leitlinie Onychomykose. *AWMF*.
- Nenoff, C Krüger, U Paasch und G Ginter-Hanselmayer (2015) Mykologie - ein Update. Teil 3: Dermatomykosen: Topische und systemische Behandlung. *JDDG - Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 13(5):S. 387–413.
- Nenoff, C Krüger, J Schaller, G Ginter-Hanselmayer, R Schulte-Beerbühl und HJ Tietz (2014) Mykologie - ein Update. Teil 2: Dermatomykosen: Klinisches Bild und Diagnostik. *JDDG - Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*.
- Nenoff, C Krüger, HJ Tietz und G Ginter-Hanselmayer (2014) Mykologie - ein Update. Teil 1: Dermatomykosen: Erreger, Epidemiologie und Pathogenese. *JDDG - Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 12(3):S. 188–212.
- Nenoff, P Mayser und S Uhrlaß (2021) Pilzinfektionen der Haut und Nägel. *Hautarzt* 72(10):S. 843–846.
- Nenoff und S Uhrlaß (2022) Trichophyton indotineae oder Trichophyton mentagrophytes Genotyp VIII - Neuer terbinafinresistenter Dermatophyt aus Indien in Deutschland und Österreich. *Focus Dermatologie* 3(1):S. 17–20.
- Nenoff, S Uhrlaß, SB Verma, S Panda et al. (2022) Trichophyton mentagrophytes ITS genotype VIII and Trichophyton indotineae: A terminological maze, or is it. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*
- Nenoff, SB Verma, S Uhrlaß, A Burmester und Y Gräser (2019) A clarion call for preventing taxonomical errors of dermatophytes using the example of the novel Trichophyton mentagrophytes genotype VIII uniformly isolated in the Indian epidemic of superficial dermatophytosis. *Mycoses* 62(1):S. 6–10.
- Nenoff, SB Verma, R Vasani, A Burmester, UC Hipler, F Wittig, C Krüger, K Nenoff, C Wiegand, A Saraswat et al. (2019) The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to Trichophyton mentagrophytes—A molecular study. *Mycoses* 62(4):S. 336–356.
- Noble, SL, RC Forbes und PL Stamm (1998) Diagnosis and management of common tinea infections. *American Family Physician* 58(1):S.163.
- o.A. (2021) Schmezlkurve. *Labster Therapy*.
- Onmeda-Redaktion. (2021) *Dermatophyten*. URL: <https://www.onmeda.de/krankheiten/krankheitserreger/pilze/dermatophyten-id200926/> (aufgerufen am 22. 02. 2023).
- Padyana, AK, S Gross, L Jin, G Cianchetta, R Narayanaswamy, F Wang, R Wang, C Fang, X Lv, SA Biller et al. (2019) Structure and inhibition mechanism of the catalytic domain of human squalene epoxidase. *Nature communications* 10(1):S.97.
- Parija, S (2009) Textbook of Microbiology and Immunology. Elsevier India.
- PZ-Redaktion (1997) Wechswlwirkungen mit systemischen Antimykotika. *Pharmazeutische Zeitung* 3.
- Redaktion, LMG. (2022) *Handpilz: Informationen Handpilz-Spezialisten*. URL: <https://www.leading-medicine-guide.com/de/erkrankungen/infektionen/handpilz> (aufgerufen am 22. 02. 2023).
- Rudramurthy, SM, SA Shankarnarayan, S Dogra, D Shaw, K Mushtaq, RA Paul, T Narang und A Chakrabarti (2018) Mutation in the Squalene Epoxidase Gene of

- Trichophyton interdigitale and Trichophyton rubrum Associated with Allylamine Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(5):e02522–17.
- Schiessl, J, S Uhrlass, K Wichmann, D Wilde, C Krüger und P Nenoff (2021) Trichophyton tonsurans-an emerging pathogen in wrestling in Germany. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und Verwandte Gebiete*.
- Seebacher, C und D Abeck (2003) Tinea capitis - aktuelles Erregerspektrum, mykologische Diagnostik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 100(44):A2872–A2877.
- Seebacher, C, JP Bouchara und B Mignon (2008) Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 166:S. 335–352.
- Solutions, LLS. (o.A) ROX Referenzfarbstoff für die qPCR. URL: <https://de.lumiprobe.com/p/rox-reference-dye> (aufgerufen am 09. 03. 2023).
- Wiegand, I, K Hilpert und RE Hancock (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* 3(2):S. 163–175.
- Wollina, U, Nenoff, G Haroske und HA Haenssle (2016) Diagnostik und Therapie von Nagelerkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt* 113(29-30):S. 509–518.
- Yamada, T, M Maeda, MM Alshahni, R Tanaka, T Yaguchi, O Bontems, K Salamin, M Fratti und M Monod (2017) Terbinafine resistance of Trichophyton clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61(7):e00115–17.
- Yamada, T, T Yaguchi, M Maeda, MM Alshahni, K Salamin, E Guenova, M Feuermann und M Monod (2022) Gene amplification of CYP51B: a new mechanism of resistance to azole compounds in Trichophyton indotineae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 66(6):e00059–22.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.



Mittweida, 03. April 2023