

Evaluierung verschiedener Untersuchungsverfahren in der Onychomykose Diagnostik:  
Nativdiagnostik und Kulturbefund im Vergleich zur mikroskopischen Beurteilung PAS-  
gefärbter Schnittpräparate.

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Frauke Ilse-Marie Sareika  
aus Saarbrücken

2010

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr PD Dr. med. J. Wenzel
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. G. Bierbaum

Tag der Mündlichen Prüfung: 03.02.2010

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès sci. Th. Bieber

Meinen Eltern, meinen Geschwistern und meiner Großmutter



## Inhaltsverzeichnis:

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Vorwort.....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
3.1	Definition .....	9
3.2	Übersicht und Hintergrund.....	9
3.2.1	Epidemiologie .....	9
3.2.2	Klassifikation der mykotischen Erkrankungen .....	10
3.2.3	Überblick über Ätiologie und Pathogenese der Onychomykose .....	13
3.2.4	Formen der Onychomykose .....	16
3.2.5	Diagnoseverfahren .....	18
3.2.6	Therapie der Onychomykose .....	20
3.3	Fragestellung der Arbeit.....	27
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>
4.1	Material .....	28
4.1.1	Datenbank der Abteilung Dermatohistologie.....	28
4.1.2	Datenbank der Mykologie.....	28
4.1.3	Daten aus der retrospektiven Aufarbeitung der Patientenakten .....	29
4.1.4	Nachuntersuchung Hefen .....	29
4.2	Methoden .....	30
4.2.1	Abgleich der Datenbanken.....	30
4.2.2	Erfassung der Ergebnisse .....	30
4.2.3	Statistische Auswertung .....	31
4.2.4	Methodik der unterschiedlichen Diagnoseverfahren .....	32
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
5.1	Mikroskopische Fälle insgesamt .....	42
5.2	Altersverteilung der Patienten, deren Proben einen positiven Pilznachweis zeigten.....	43
5.3	Geschlechterverhältnis der Patienten mit Pilznachweis.....	44
5.4	Erreger der Onychomykose.....	45
5.5	Entnahmeort der Nagelprobe .....	47

5.6	Dauer und Kosten der einzelnen Verfahren .....	49
5.7	Auswertung des Vergleichs der Diagnoseverfahren .....	50
5.7.1	Gegenüberstellung der Einzelmethoden .....	50
5.7.2	Fälle mit positivem Ergebnis in nur einem Testverfahren .....	51
5.7.3	Verfahrensspezifisch positive Ergebnisse .....	52
5.7.4	Sensitivität .....	53
5.7.5	Negativer prädiktiver Testwert .....	55
5.7.6	Mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate .....	56
5.8	Nachuntersuchung Hefen .....	57
5.9	Antimykotische Vorbehandlung von Patienten .....	58
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
6.1	Patientenkollektiv .....	62
6.2	Maximum der Onychomykoseerkrankungen zwischen 60. und 70. Lebensjahr .....	62
6.3	Höhere Prävalenz bei männlichen Patienten im Kollektiv .....	64
6.4	Erreger der Onychomykose hauptsächlich Dermatophyten .....	65
6.5	Nachuntersuchung Hefen .....	66
6.6	Mehrzahl der Onychomykosefälle betrifft die Fußnägel .....	67
6.7	PAS kostenintensiver als bisheriger Goldstandard, aber zeitnahes Ergebnis .....	68
6.8	Vergleich der Diagnoseverfahren .....	70
6.8.1	Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung in der Zusammenschau .....	70
6.8.2	Die vergleichbar aufgebauten Studien haben geringere Fallzahlen, aber ähnliche Ergebnisse .....	73
6.9	Bei Proben mit antimykotischer Vorbehandlung ist die histologische PAS-Färbung überlegen .....	77
<b>7</b>	<b>Fazit .....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>88</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>90</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
C. albicans	Candida albicans
D. m.	Diabetes mellitus
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure/ deoxyribonucleic acid
D-H-S-System	Dermatophyten-Hefen-Schimmelpilze-System
E. floccosum	Epidermophyton floccosum
GF Färbung	Gridley Fungus Färbung
GMS Färbung	Gomori-Methenamin-Silber Färbung
GOÄ	Gebührenordnung für Ärzte
Histologie	Mikroskopische Untersuchung PAS gefärbter Schnittpräparate
NPV	Negative predictive value = negativer prädiktiver Vorhersagewert
PAS	Periodic-acid-Schiff = Perjod-Schiff-Säure – in dieser Arbeit auch Abkürzung für: Mikroskopische Untersuchung PAS gefärbter Schnittpräparate
PCR	Polymerase chain reaction= Polymerase Kettenreaktion
Rhod. sp.	Rhodotorula species
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
T. rubrum/mentagrophytes/...	Trichophyton rubrum/...
ZNS	Zentralnervensystem

## 2 Vorwort

Bei der Onychomykose handelt es sich um eine Pilzinfektion der Finger- oder Zehennägel, welche meist durch Dermatophyten hervorgerufen wird und aufgrund des chronischen Verlaufs zu einer Destruktion der Nägel führt. Sie entsteht an den Zehennägeln häufig auf dem Boden eines Fußpilzes und stellt die häufigste Ursache für Nageldeformitäten dar.

In der Diagnostik der Onychomykose werden aktuell drei Verfahren konkurrierend bzw. gleichzeitig eingesetzt: 1. Nativdiagnostik, 2. Kulturbefund und 3. die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate. Ziel der Arbeit war es, die Sensitivität dieser Verfahren am Patientenkollektiv der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universität Bonn im Zeitraum von 2000 bis 2006 zu vergleichen, um so die jeweilige diagnostische Aussagekraft zu evaluieren. Da der Nagelpilz in der immer älter werdenden deutschen Bevölkerung ein zunehmendes Problem darstellt, ist eine sichere Diagnose für eine erfolgreiche Therapie und damit eine Eindämmung der Ausbreitung unabdingbar. Der Einsatz von Antimykotika ohne vorherige eindeutige Diagnose- und Indikationsstellung führt zu einer unnötigen Gefährdung des Patienten durch Arzneimittelnebenwirkungen (schlimmstenfalls bis zum akuten Leberversagen) sowie zu vermeidbaren Kosten für das Gesundheitssystem. Von daher ist es wichtig, Standardverfahren und neuere Testverfahren – wie die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate – auf ihre Sensitivität hin zu überprüfen und miteinander zu vergleichen, um sie gegebenenfalls mit in die Diagnostik der Onychomykose aufzunehmen.

## **3 Einleitung**

### **3.1 Definition**

Die Onychomykose ist eine chronische, langsam die Nagelplatte destruierende Pilzinfektion der Finger- oder Zehennägel, wobei letztere oftmals auf dem Boden eines Fußpilzes entsteht. Erstes klinisches Zeichen ist der Verlust der Transparenz und des Glanzes der Nägel, später kommen hyperkeratotische Wucherungen hinzu, die bröckelig zerfallen können. Der Nagel wird dicker, brüchiger und es kommt oft zu einer gelblichen Verfärbung. Häufigste Erreger sind die Dermatophyten, des Weiteren können auch Schimmelpilze und Hefen zu einer Onychomykose führen. Als Infektionskrankheit kann sich der Nagelpilz auf andere Körperteile des Betroffenen ausbreiten und damit zu Folgeerkrankungen wie bakteriellen Entzündungen bis hin zum Erysipel führen. Eine Maximalvariante einer Pilzerkrankung stellt die sogenannte „tiefe Trichophytie“ dar, eine sehr schmerzhaft, abszedierende Entzündung mit Eiterabsonderung aus den Haarfollikeln und Lymphknotenschwellung. Sie heilt unter Narbenbildung ab und hinterlässt eine Alopezie. Die Onychomykose ist eine infektiöse Erkrankung und kann bei mangelnden Vorsichtsmaßnahmen in der Umgebung des Patienten weiter verbreitet werden.

### **3.2 Übersicht und Hintergrund**

#### **3.2.1 Epidemiologie**

Vor dem zweiten Weltkrieg zählte die Onychomykose noch zu den seltenen Erkrankungen, nach 1950 kam es zu einem stetigen Anstieg ihrer Prävalenz parallel zu dem der Tinea pedis (Haneke, 1999). Sie ist wie alle Oberflächenmykosen weltweit verbreitet, vor allem die Industrieländer weisen aber eine hohe Zahl von Erkrankungsfällen und eine stetige Progredienz auf. Heute sind ca. 20 % der Erwachsenen betroffen (Braun-Falco et al., 2005).

Männer haben laut der „Foot-Check-Studie“ sowie der „Achilles-Studie“ insgesamt ein höheres Risiko an Nagelpilz zu erkranken als Frauen (Abeck et al., 2000; Piérard, 2001). Die Ursache hierfür ist nicht ganz eindeutig. In der „Achilles-Studie“ wird eine häufigere Nutzung von Gemeinschaftsduschen bei Männern nach dem Sport oder der Arbeit (z.B. in der Schwerindustrie) als mögliche Ursache dafür erwogen (Burzykowski et al., 2003).

Bei Kindern kommen Onychomykosen insgesamt selten vor. Studien zeigen, dass bis zum Alter von 12 Jahren die Prävalenz einer durch Dermatophyten hervorgerufenen Nagelpilzerkrankung unter 0,2 % liegt (Nolting et al., 2002). Ein Grund dafür ist möglicherweise das raschere Nagelwachstum bei Kindern, welches ein Vordringen der Pilze verhindert, sowie die geringere Oberfläche der Nägel, wodurch den Erregern nur in ein kleineres Gebiet zum Eindringen zur Verfügung steht. Außerdem haben Kinder weniger Kontakt mit Pilzen und daher auch eine niedrigere Prävalenz für Fußpilz, welcher oft der Wegbereiter für den Nagelpilz ist (Elewski, 1998).

Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenz für das Auftreten von Onychomykosen (Burzykowski et al., 2003). Zum einen nehmen die prädisponierenden Faktoren – Diabetes mellitus (D.m.), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), wiederholte Nageltraumata – mit dem Alter zu und akkumulieren, zum anderen sinkt mit zunehmendem Lebensalter die Geschwindigkeit des Nagelwachstums und das Immunsystem ist häufig nicht mehr intakt. Alle drei Faktoren können zu einer vermehrten Anfälligkeit für Pilzinfektionen führen (Tosti et al., 2005).

### **3.2.2 Klassifikation der mykotischen Erkrankungen**

Pilze sind Eukaryonten, d. h. ihr Genom befindet sich in einem speziellen Organell, dem Zellkern. Zusätzlich besitzen sie Organellen, die ebenfalls DNS enthalten (z.B. Mitochondrien) und frei im Zytoplasma liegen. Pilze sind heterotroph, sie ernähren sich also von organischen Substanzen, die sie nach enzymatischem Aufschluss durch die Zellwand aufnehmen (Kretschmar und Hof, 2002).

Die Pilzzellen besitzen im Gegensatz zur Säugetierzelle eine Zellwand, welche v.a. Glukane und Chitin enthält (vgl. Pflanzenzelle: Zellwand aus Zellulose). In der Zytoplasmamembran der Pilzzelle ist Ergosterin enthalten, wodurch sie sich deutlich von der Cholesterin-enthaltenden Zytoplasmamembran der Säugetierzelle unterscheidet. Diese Besonderheit ist ein bedeutender Ansatzpunkt für die Entwicklung nebenwirkungsarmer spezifischer Antimykotika, die z. B. in die Ergosterin-, Chitin- oder Glukanproduktion eingreifen.

Nach morphologischen Gesichtspunkten teilt man die Pilze in Myxomyceten, Phycomyceten, Ascomyceten, Basidiomyceten und Deuteromyceten ein (Hofmann, 2003).

Humanpathogene Pilze stammen v. a. aus der Gruppe der Deuteromyceten oder Fungi imperfecti (so bezeichnet, weil die sexuellen Organe bei vielen Pilzarten nicht bekannt sind).

Für den medizinischen Gebrauch wird eine Einteilung der relevanten humanpathogenen Pilze in drei Gruppen bevorzugt (**D-H-S- System**):

- Dermatophyten (*Trichophyton*, *Microsporum*, selten *Epidermophyton*)
- Hefen (*Candida*, *Malassezia*, *Cryptococcus*)
- Schimmelpilze (*Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus species*).

Als Erreger der Onychomykose kommen Dermatophyten in 91 %, Hefen in 5,5 % und Schimmelpilze in 3 % der Fälle vor (Grover et al., 2003).

Die meisten Pilze sind fakultativ pathogen, ihre Pathogenität ist abhängig von der Situation des Wirtes bezüglich der Infektabwehr, Beschaffenheit der konkurrierenden Normalflora, Begleiterkrankungen und deren Therapie. Pilze sind also klassische Opportunisten, die meist nur dann zu einer Infektion führen, wenn die Umstände es erlauben z.B. bei Störungen der Immunabwehr oder der Hautbarriere.

**Dermatophyten** haben ihr Wachstumsoptimum unterhalb von 37°C (am besten Raumtemperatur), daher befallen sie bevorzugt die Haut und ihre Anhangsorgane (Tietz, 2001c). Alle Dermatophyten besitzen Keratinasen, die humanes Keratin verdauen, so dass sie sich vom Material der Haare und Nägel ernähren können.

In schweren Fällen kommen tiefe abszedierende Infektionen vor, bei denen die Pilze entlang der Haare bis in die Follikel vordringen und dort eine Follikulitis und Perifollikulitis hervorrufen. Bei der Tinea capitis nennt man diese Ausprägungsform „Kerion celsi“. Klinisch findet man eine schmerzhaft, entzündliche Schwellung mit leicht ausziehbaren Haaren, Eiterabsonderung aus den Follikeln und Bildung sezernierender Fisteln. In der Regel geht die Erkrankung mit einer Lymphadenopathie einher. Teilweise konfluieren die entzündlichen Plaques zu großen Geschwulsten, die oft nur unter Bildung entstellender Narben abheilen. Zudem wird die eigentliche mykologische Ursache der Entzündung häufig verkannt, so dass erst verspätet eine wirksame kausale Therapie initiiert werden kann.

Molekulargenetische Untersuchungen zeigen, dass die drei Gattungen der Dermatophyten nicht monophyletisch sind. Daher erscheint eine Klassifikation nach ökologischer Nische (anthropophil, zoophil, geophil) und nach hervorgerufenem Krankheitsbild eindeutiger. Auch in der Praxis hat sich diese Einteilung bewährt, denn unter klinischen, therapeutischen und epidemischen Gesichtspunkten ist es wichtig, die ökologische Nische des vorliegenden Dermatophyten zu kennen. So sind zum Beispiel zoophile Dermatophyten meist obligat pathogen und äußerst virulent, wodurch andere Therapieformen gefragt sind als bei den schwächer virulenten anthropophilen und geophilen Dermatophytenarten.

Vorkommen	Dermatophytenart		
	Antropophil	Zoophil	Geophil
Häufig	T. rubrum T. interdigitale T. tonsurans E. floccosum	M. canis T. mentagrophytes T. verrucosum T. equinum	M. gypseum
Selten	T. violaceum T. soudanense T. schoenleinii M. andounii	M. gallinae M. nanum M. versicolor	M. cookei M. terrestre

**Tabelle 1: Einteilung der Dermatophyten nach Häufigkeit und ökologischer Nische (Tietz, 2001c).**

**Hefen** haben ein völlig anderes Besiedlungsmuster. Bevorzugt befallen sie das feucht-warme Milieu der Schleimhäute und Hautfalten, sie können aber auch Pilzinfektionen der inneren Organe hervorrufen. Sie vermehren sich durch Sprossung, bilden teilweise Pseudomyzele und zeigen bei Körpertemperatur ein fast bakterienartig schnelles Wachstum.

**Schimmelpilze** sind in der Natur weit verbreitet. Sie erlangen wie oben genannt humanpathogene Bedeutung als opportunistische Krankheitserreger, z.B. bei Immunschwäche (Aspergilluspneumonie durch *Aspergillus fumigatus*) oder schwerer Verbrennung. Des Weiteren haben Schimmelpilze unter Umständen eine allergene Wirkung und können teilweise Mykotoxine bilden. So produziert beispielsweise *Aspergillus flavus*, welcher in verdorbenen Lebensmitteln vorkommen kann, das Aflatoxin B, ein starkes Karzinogen.

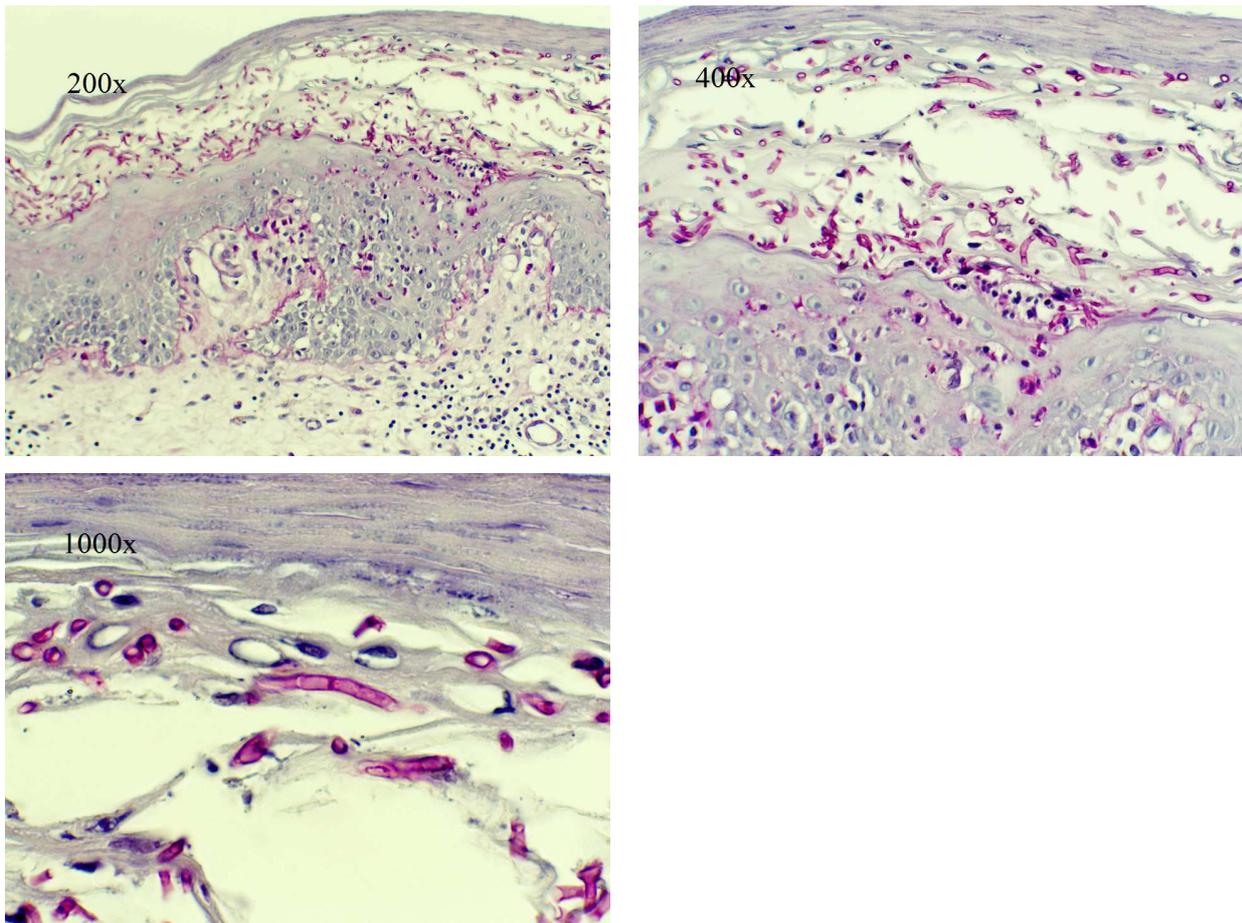


Abbildung 1: Tinea corporis lichtmikroskopisch nach histologischer Aufbereitung und PAS-Färbung

### 3.2.3 Überblick über Ätiologie und Pathogenese der Onychomykose

Bei der Onychomykose handelt es sich um eine Infektionskrankheit ohne Selbstheilungstendenz. Sie kann sich vom Infektionsherd auf weitere Körperbereiche ausbreiten sowie vom Träger auf andere Menschen übertragen werden (Haneke, 1999). Außerdem vermindert Studien zufolge eine Pilzinfektion der Nägel die Lebensqualität, indem sie sowohl zu Schmerzen, z.B. beim Schuhe tragen, als auch zu psychischem Leid (vermindertes Selbstbewusstsein, Vermeidung von Beziehungen etc.) führt (Drake et al., 1999). Des Weiteren kann sie Eintrittspforte für Infektionen mit beispielsweise bakteriellen Erregern sein und bei entsprechender Prädisposition zu schweren Erkrankungen wie Phlegmone und Erysipel führen. Daher sollte die Krankheit in jedem Fall behandelt werden.

Die **Pathogenese** des Nagelpilzes ist multifaktoriell bedingt. Neben erblichen Anlagen (es gibt Hinweise auf eine autosomal-dominante Vererbung der Empfänglichkeit für Onychomykose

(Faergemann et al., 2005; Haneke, 1993)), peripheren Neuropathien, pAVK, D. m. und anderen Stoffwechselerkrankungen tragen auch zu enge Schuhe, Fußfehlstellungen, übertriebene Mani- bzw. Pediküre sowie wiederholte Traumata (z.B. beim Sport) zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Nagelinfektionen bei. Gerade bei Diabetikern, die als Spätfolge oft auch an Sensibilitätsstörungen und Minderdurchblutung der Füße leiden, ist der Nagelpilz häufig Eintrittspforte für bakterielle Infektionen.

Der verdickte Nagel kann zu Traumata der umgebenden Haut führen, woraus Pilz- oder bakterielle Infektionen derselben resultieren, die sich wiederum aufgrund der verminderten Immunabwehr des Diabetikers zu einem Ulcus oder einem Erysipel ausweiten können. So tragen Nagelpilzerkrankungen zur Progression des diabetischen Fußsyndroms und somit zur früheren Notwendigkeit einer Amputation von Teilen der unteren Extremität bei (Gupta und Linh, 2006b). Ähnliches gilt auch für die verminderte Sensibilität und Immunabwehr im Bereich der unteren Extremität bei pAVK-Patienten.

Die Risikofaktoren stellt Elewski in einem Artikel wie folgt zusammen (Elewski, 2000):

### **Risikofaktoren der Onychomykose**

- höheres Lebensalter
- genetische Faktoren und - familiäre Prädisposition
- schlechter Allgemeinzustand
- häufige Traumata des Nagels (Sport, zu enge Schuhe...)
- Kontakt mit Pathogenen in der Umwelt
- warmes, feuchtes Klima
- Fitness-Trend (Traumata der Füße + gemeinsame Duschen und Geräte)
- öffentliche Badeanstalten
- geschlossenes Schuhwerk
- Immunsuppression
- hohe Prävalenz der Tinea pedis

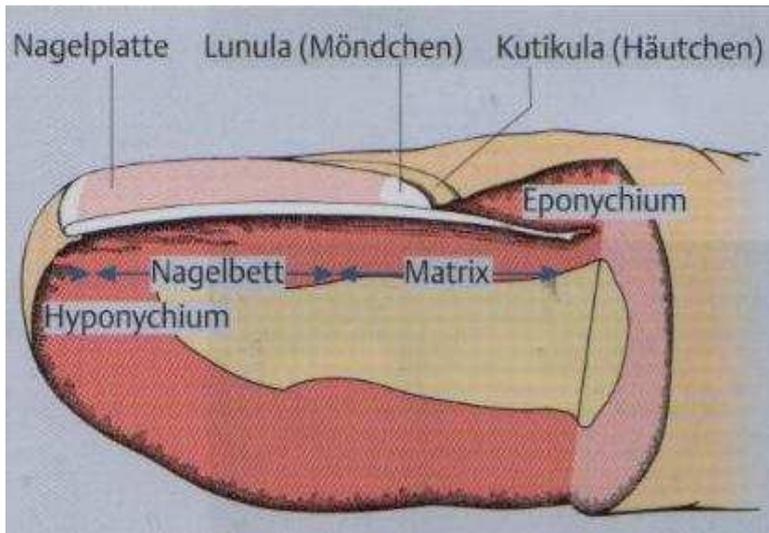


Abbildung 2: Aufbau und Anatomie des Nagels und des Nagelbettes (Jung, 2003).

Die oben genannten Erreger einer Onychomykose kommen ubiquitär vor, wobei besonders Orte, an denen viele Menschen barfuss laufen, als Infektionsquelle zu nennen sind (z.B. Schwimmbäder, Sauna, Turnhallen, usw.). In den meisten Fällen entsteht bei Prädisposition und Kontakt mit einem Erreger zunächst eine *Tinea pedis*, aus der sich auch eine *Tinea unguium* entwickeln kann. Die Erreger dringen dabei meist über das Hyponychium, seltener von proximal über das Eponychium zur Nagelmatrix vor und führen dort zu Schäden der Nagelplatte (s.u.). Insgesamt sind die Zehennägel häufiger betroffen als die Fingernägel (etwa im Verhältnis 4:1) (Effendy et al., 2005). An den Füßen erkrankt der Großzehennagel am häufigsten, an der Hand ist es der Daumennagel. Dies hängt vermutlich mit der Größe der Nägel zusammen, wodurch sie häufiger Traumata ausgesetzt sind als die übrigen, kleineren Finger- und Zehennägel (Grover et al., 2003). Außerdem ist oft nur eine Hand oder ein Fuß betroffen, und die Zahl infizierter Nägel nimmt mit zunehmender Krankheitsdauer zu, wobei auch ein Strahl vollkommen ausgespart bleiben kann.

**Pathophysiologisch** betrachtet gilt Feuchtigkeit in Kombination mit Temperaturen bis 37°C als wichtigster Faktor für die Infektion der Haut und des Nagels mit Dermatophyten (Baden und Soter, 1984). Normalerweise haben diese Pilze nur eine sehr geringe Fähigkeit die Haut zu schädigen, und die bei einer Infektion entstehende Entzündung ist vor allem auf die Reaktion des Körpers gegenüber dem Eindringling zurückzuführen.

Die gerade genannte Kombination von Feuchtigkeit und Wärme kommt häufig auch durch das permanente Tragen fester, wenig luftdurchlässiger Schuhe – z. B. Arbeitsschuhe – vor. Hier entsteht das perfekte Mikroklima für ein Pilzwachstum durch den Fußschweiß und die Körperwärme. Das Tragen von Arbeitsschuhen ist wiederum häufig in typischen Männerberufen Pflicht, so dass sich hier evtl. eine Erklärung für die festgestellte höhere Prävalenz beim männlichen Geschlecht ergibt.

Als Ursache für die Kolonisation der Haut und ihrer Anhangsorgane wird vermutet, dass die Pilze Eisen und andere Nährstoffe benötigen, die vor allem im *stratum corneum* der Haut, nicht aber in tieferen Schichten zu finden sind. Zudem haben Dermatophyten (s.o.) ihr Wachstumsoptimum unterhalb von 37°C, so dass sie auf der Körperoberfläche bessere Wachstumsbedingungen finden.

Während der Kolonisation wird der Körper gegenüber den Pilzantigenen sensibilisiert und entwickelt eine verspätete Hypersensibilität. Im Experiment trat diese Reaktion zwischen dem 10. und dem 15. Tag nach dem Eindringen des Erregers auf und ist für die Entzündungsphase der Erkrankung verantwortlich (Baden und Soter, 1984). Aufgrund der Entzündung kommt es zu einem Verlust der epidermalen Integrität, so dass der Dermatophyt mit dem Milieu tieferer Hautschichten in Berührung kommt. Dies führt zu einer Verlangsamung des Pilzwachstums, was vermutlich mit der Diffusion ungesättigten Transferrins in das *stratum corneum* zusammenhängt, wo dieses freies Eisen bindet und damit die essentiellen Nährstoffe des Pilzwachstums reduziert.

Eine Ausnahme bildet – wie oben erwähnt – die tiefe Trichophytie, bei der die Pilze entlang der Haarbälge in tiefere Schichten eindringen.

### **3.2.4 Formen der Onychomykose**

Es lassen sich verschiedene Formen der Nagelmykose unterscheiden, was v. a. unter therapeutischen Gesichtspunkten von Bedeutung ist.

#### 1. Distolaterale subunguale Onychomykose

Diese ist die häufigste Form des Nagelpilzes. Den Ausgangspunkt stellt meist eine Pilzinfektion der umgebenden Haut dar, von der aus der Pilz über das Hyponychium (Dermis des Nagelbettes) in die Unterseite der Nagelplatte eindringt. Von dort breitet er sich langsam von distal nach pro-

ximal aus, wo er die Nagelmatrix erreicht. Es entwickelt sich eine subunguale Hyperkeratose, wodurch die anfangs noch intakte Nagelplatte im Laufe der Zeit distal angehoben wird (Onycholysis semilunaris) und eine Gelbverfärbung (Dyschromasie) entsteht. Wird der erkrankte Nagel zusätzlich bakteriell superinfiziert, so resultiert eine schmutziggelbe bis grüne Verfärbung – je nach Erreger (z.B. *Pseudomonas aeruginosa* – grüne Farbe).

Falls die durch den Pilz verursachte Hyperkeratose sehr ausgeprägt ist, kann sie zur Entwicklung von Krümelnägeln – einer sogenannten Onychodystrophie – führen.

## 2. Proximale subunguale Onychomykose

Bei dieser selteneren Form erfolgt die Infektion über die Haut des proximalen Nagelwalls, von wo aus sie auf die Kutikula übergreift und sich dann entlang des Eponychiums (Epithel der Unterseite des proximalen Nagelwalls) bis zur Nagelmatrix ausbreitet. Von dort dringen die Pilze in die Nagelplatte ein, führen zu einer Verfärbung und Dystrophie und wachsen innerhalb der Hornplatte nach distal weiter aus.

Zwar ist die proximale subunguale Onychomykose insgesamt selten, aber bei AIDS-Patienten wird diese Form häufig beobachtet und kann einen frühen Marker einer HIV-Infektion darstellen, wobei der Verursacher hier in über 50 % der Fälle *T. rubrum* ist (Elewski, 1998).

## 3. Leukonychia trichophytica

Synonym wird die Bezeichnung „weiße superfizielle Onychomykose“ verwendet. Betroffen sind meist die Zehennägel und der Erreger ist meist *Trichophyton interdigitale* (*T. interdigitale*). Die Pilzelemente dringen nach Mazeration der Nageloberfläche in feuchtwarmem Milieu in die oberflächlichen dorsalen Schichten des Nagelkeratins ein. Klinisch manifestiert sich typischerweise eine weißliche Verfärbung, die entweder punktuell auftritt, oder fast die ganze Nagelplatte betrifft.

## 4. Dystrophische Onychomykose

Diese Form kann als Endzustand einer lange bestehenden Onychomykose auftreten, v. a. wenn die Nagelmatrix in erheblichem Maße mitbefallen ist. Hierbei ist das gesamte Nagelorgan in seiner Anatomie grundlegend gestört und es kommt zu schweren Nageldystrophien.

### 5. Onychia et paronychia candidosa

Bei diesem Krankheitsbild handelt es sich um eine Sonderform des Nagelpilzes, die von den übrigen Formen deutlich abzugrenzen ist. Im Gegensatz zu den übrigen Onychomykoseformen kommt es zu einer chronischen Entzündung des proximalen und lateralen Nagelwalles und bei länger bestehender Erkrankung resultieren Matrixschädigungen, die wiederum zu einer unregelmäßigen Struktur der Nagelplatte führen.

Bei der klinischen Inspektion fällt zunächst die typische Rötung und Schwellung des Nagelwalls auf. Oft ist diese assoziiert mit Querrillen der Hornplatte und teilweise auch mit Verfärbungen der Nägel, falls eine zusätzliche Bakterienbesiedlung vorliegt. Erreger sind hier überwiegend Candida-Arten, v.a. *Candida albicans* (*C. albicans*). Seltener verursachen andere Candida-Arten, wie z.B. *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*) und *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*), dieses Krankheitsbild.

Auch in frühen Stadien können bereits grünlich-bräunliche Verfärbungen eines schmalen Streifens der Nagelplatte vorhanden sein.

**Differentialdiagnostisch** kommen insbesondere die Psoriasis, teilweise auch eine isolierte Nagelpsoriasis, Ekzeme, welche zu den sogenannten Ekzemenägeln führen, und selten ein Lichen ruber des Nagelorgans in Frage.

### **3.2.5 Diagnoseverfahren**

Die korrekte Diagnosestellung bei einer Pilzinfektion des Nagels ist von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Therapie. Da nur etwa die Hälfte aller Nageldystrophien durch Pilze hervorgerufen werden, gilt es durch eine sorgfältige Diagnostik die möglichen Differentialdiagnosen (Psoriasis, Lichen ruber, Nageltraumata, etc.) auszuschließen, um dann eine kausale Therapie beginnen zu können.

Am Anfang der Diagnostik stehen die Anamnese und die klinische Inspektion, welche den Ausschlag geben, weitergehende Laboruntersuchungen anzuordnen.

Der zweite Schritt besteht in der Entnahme einer Probe aus dem suspekten Bereich. Hier ist die korrekte Durchführung der Probenentnahme zu beachten, die später genauer erläutert wird.

Die gewonnenen Nagelspäne können verschiedenartig aufbereitet und untersucht werden (siehe Tabelle 2):

Diagnoseverfahren	
Hauptverfahren:	
Nativbefund	Mikroskopie des Nativpräparates nach Methyleneblaufärbung
Kulturbefund	Makro- und mikroskopische Analyse der gewachsenen Kulturen auf Agar nach Inkubation bei Zimmertemperatur
Mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate (kurz PAS)	Mikroskopische Analyse paraffinfixierter Schnitte nach PAS-Färbung
Sonstige:	
Fluoreszenzmikroskopie	Anfärbung von Pilzelementen mittels fluoreszierender Farbstoffe im Nativpräparat und fluoreszenz-mikroskopische Analyse
Immunhistochemie	Nachweis von Pilzelementen mittels Antikörper
PCR	Erregernachweis anhand von bekannten Gensequenzen nach Amplifizierung des vorhandenen DNA-Materials
Flow cytometry	Speziesnachweis nach Abtrennung einzelner Pilzzellen vom Nagelmaterial, anhand von Proteinen, Zellgröße etc. im Durchflußzytometer

**Tabelle 2: Diagnoseverfahren der Onychomykose**

### 3.2.6 Therapie der Onychomykose

Früher wurde die Onychomykose vor allem als kosmetisches Problem angesehen, was nicht immer therapiert wurde, da auch die zur Verfügung stehenden Medikamente keine guten Erfolgsraten aufwiesen. Inzwischen hat sich die Wahrnehmung geändert und die Infektionserkrankung gilt als ernstzunehmendes Gesundheitsproblem, welches Aufmerksamkeit verdient, weil sie schwerwiegende Komplikationen nach sich ziehen kann (Diabetiker, pAVK-Patienten u.s.w. - s.o.) (Gupta und Linh, 2006b).

Zur Behandlung des Nagelpilzes stehen die Lokalthherapie mit speziellen Antimykotika enthaltenden Nagellacken, die systemische Gabe von Antimykotika sowie die Entfernung des geschädigten Nagelmaterials mittels Harnstoffcremes oder begrenzten mechanischen Methoden zur Verfügung.

Beide Methoden bieten Vor- und Nachteile, aber in Konsensus-Konferenzen erarbeitete Richtlinien erleichtern die Entscheidung für die passende Therapieform (Seebacher und Brasch, 2006).

Die topische Monotherapie wird nach der internationalen Konsensus-Konferenz 2005 von Lecha et al. nur bei einem Befallsgrad von unter 50 % des Nagels empfohlen, vorausgesetzt die Nagelmatrix ist nicht mitbetroffen (Lecha et al., 2005). Zusätzlich beschränkt sich die Indikation einer rein lokalen externen Therapie auf zwei Formen der Onychomykose, die Leukonychia trichophytica und die distolaterale subunguale Onychomykose.

In allen anderen Fällen verspricht nur eine systemische Therapie – nach neueren Erkenntnissen am besten in Kombination mit einer Lokalthherapie – zufriedenstellende Ergebnisse. Dabei sprechen nicht alle Erreger auf jedes Antimykotikum an. So sind beispielsweise Nicht-Dermatophyten wie die Hefen lediglich gegenüber Azolpräparaten empfindlich (Niewerth und Korting, 1999).

Die Therapie einer Onychomykose muss über einen langen Zeitraum erfolgen, fordert eine hohe Compliance vom Patienten und kann kostenintensiv sein. Für Fingernägel beträgt die Behandlungsdauer 3 - 6 Monate, für Zehennägel sind es 6 - 12 Monate oder länger (Haneke, 1993; Tietz und Sterry, 2002c). Ursächlich für diesen langen Behandlungszeitraum sind das Fehlen von Blutgefäßen in der Nagelplatte und damit die schlechte Erreichbarkeit durch Medikamente, die im Nagelorgan vorhandenen Hohlräume in denen sich pharmakokinetisch nicht erreichbare Erreger-

keimzentren befinden sowie Pilzsporen, die v. a. von Ergosterolhemmern kaum eliminiert werden können. Sie können daher, auch wenn sie in noch so geringer Zahl zurückbleiben, zu einem Rezidiv führen. Hinzu kommen die natürliche Resistenz des *T. interdigitale* gegenüber Fluconazol und Griseofulvin sowie dessen eingeschränkte Empfindlichkeit gegenüber Itraconazol.

Daher sind die korrekte Diagnose und der Ausschluss von differentialdiagnostisch in Frage kommenden anderen Ursachen der Nageldystrophie umso wichtiger.

Um trotz der genannten Schwierigkeiten zu einem möglichst langfristigen Heilungsergebnis zu kommen, kombiniert man – wie schon angedeutet – die Therapieformen zur sogenannten „Dreischlagtherapie“ bestehend aus: 1. topischen Antimykotika, 2. atraumatischer Nagelentfernung und 3. systemischer antimykotischer Therapie (Mayer, 2007). Eine Kombinationsbehandlung ist laut neueren Publikationen effektiver und letztlich auch kostengünstiger (Bristow und Baran, 2006; Seebacher und Brasch, 2006).

#### Adjuvante Maßnahmen:

Bevor mit jeglicher Form der Behandlung begonnen wird, sollte der zerstörte Teil des Nagels atraumatisch entfernt werden, da dies in mehreren Studien zu deutlich besseren Behandlungsergebnissen geführt hat (multizentrische Studie von Fräki et al., 1997: nach atraumatischer Nagelentfernung Heilung bei 71 % der Patienten, ohne vorherige Nagelentfernung bei 51 %).

Hierzu eignen sich harnstoffhaltige Salben mit 20 bis 40 % Harnstoff in einer Salbengrundlage oder Kalium iodatum 35 % in Lanolin. Eine andere Möglichkeit ist die mechanische Entfernung befallener Nagelanteile und subungualer Hyperkeratosen mittels einer Fräse oder eines Erbium-YAG-Lasers. Die von vielen Patienten gefürchtete chirurgische Nagelextraktion wird heute nicht mehr durchgeführt, da sie äußerst schmerzhaft ist, zu Schädigungen des Nagelbettes führen kann und zudem oft eine zeitweise Arbeitsunfähigkeit nach sich zieht. Bei der Nagelablation ist darauf zu achten, dass steril gearbeitet wird und ausreichende Absaugvorrichtungen vorhanden sind, um eine Pilzkontamination der Umgebung zu vermeiden.

Die Desinfektion der Schuhe und Strümpfe aber auch der Handtücher und Badeteppiche während und vor allem nach der Behandlung stellt eine wichtige ergänzende Maßnahme dar. Um Pilze und Pilzsporen abzutöten, ist eine Temperatur von 60°C erforderlich. Hinzu kommt die Aufklärung

des Patienten über Infektionsquellen in der eigenen Umgebung und die prädisponierenden Faktoren für die Onychomykose (Feuchtigkeit, Traumata, Durchblutungsstörungen, Tinea pedis, etc.) sowie die Möglichkeiten zu deren Beseitigung.

#### Lokaltherapie:

Mit der Lokaltherapie kann bereits direkt nach der Bestätigung der Verdachtsdiagnose durch ein positives Nativpräparat begonnen werden. Dies ist insofern von Vorteil, als es mehrere Wochen dauern kann, bis die Kultur eindeutig ablesbar ist und der Erreger feststeht. Erst dann kann eine erregerabhängige systemische Therapie eingeleitet werden.

Zur Verfügung stehen verschiedene antimykotische Nagellacke, die nach der Desinfektion und dem Aufrauen des Nagels mittels einer Nagelfeile (zur besseren Penetration) aufgetragen werden. Wichtig ist es auch, die seitlichen Nagelanteile sorgfältig zu bestreichen, da der Wirkstoff senkrecht ins Keratin diffundiert, und diese Anteile sonst nicht mit dem Wirkstoff in Berührung kommen.

Vom Wirkstoff her hat sich u. a. das Ciclopiroxolamin bewährt, da es nicht an der Ergosterol-Biosynthese ansetzt, sondern über eine irreversible Bindung an die Zellwand sowie an zytoplasmatischen Membranen und Mitochondrien seine fungizide Wirkung entfaltet. Dadurch werden auch Pilzsporen im Ruhestadium, das heißt mit sehr wenig Stoffwechselfunktionen und abgeschalteter Ergosterolsynthese, erreicht.

In einigen Studien wird allerdings auch die herausragende Effizienz von Amorolfin hinsichtlich Penetration, Aufbau der minimalen inhibitorischen Konzentration, Persistenz des Wirkstoffes nach Beenden der Therapie und Heilungsrate nachgewiesen (Lecha et al., 2005).

Wie oft der Nagellack aufgetragen werden muss, ist von Präparat zu Präparat sehr unterschiedlich. Manche (z.B. Amorolfin) werden nur ein- bis zweimal pro Woche angewandt, andere (z.B. Ciclopiroxolamin) werden im ersten Behandlungsmonat jeden zweiten Tag, im zweiten Monat zweimal pro Woche und ab dem dritten Monat einmal pro Woche auf die befallenen Nägel aufgetragen. Die Therapiedauer ist abhängig vom Erfolg, beträgt aber in der Regel mindestens sechs Monate (Tietz und Sterry, 2002d).

Ein großer Vorteil der lokalen Therapie ist weiterhin die geringe Anzahl an Nebenwirkungen. Selten treten Ekzeme, Rötung und brennende oder stechende Missempfindungen direkt am Auftragungsort auf. Sie sind meist selbstlimitierend bei Fortführung der Behandlung.

<b>Therapieform:</b>	<b>Indikation:</b>
Lokale Monotherapie	< 50 % der Nagelmatrix befallen
Systemische + Lokale Therapie	> 50 der Nagelmatrix befallen
Adjuvante Maßnahmen	Immer

**Tabelle 3: Indikation der unterschiedlichen Therapieformen**

#### Systemische Therapie:

In allen Fällen, in denen mehr als 50 % der Nagelmatrix befallen sind, ist eine systemische, meist orale Therapie mit Antimykotika indiziert (Seebacher und Brasch, 2006). Da die zur Verfügung stehenden Pharmaka ein begrenztes Wirkungsspektrum haben, muss vor Beginn der Behandlung die Pilzspezies mittels Kultur identifiziert werden. Außerdem gilt es, Kontraindikationen für das gewählte Präparat auszuschließen, denn einige Mittel beeinträchtigen zum Beispiel die Wirkung anderer Medikamente. Aufgrund der Tatsache, dass viele der Antimykotika hepatisch metabolisiert werden, empfiehlt es sich, vor Beginn der Therapie und je nach Risikoprofil auch während der Behandlung laborchemische Kontrollen durchzuführen. Antimykotika können zur Einschränkung der Leberfunktion und in seltenen Fällen bis zum akuten Leberversagen führen.

Orale Antimykotika dringen langsamer in die Nagelplatte ein als topische, persistieren dafür aber auch nach Beendigung der Therapie bis zu vier oder sechs Monaten in der Nagelplatte, so dass die Behandlungsdauer verringert werden kann oder eine intermittierende Therapie möglich ist (Lecha et al., 2005).

Es stehen verschiedene Antimykotika zur Auswahl, die sich sowohl in ihren Wirkungsmechanismen als auch im Wirkungsspektrum und den Einnahmemodi unterscheiden.

Der Wirkstoff **Griseofulvin** zählt zu den Benzofuranen und hemmt verschiedene Prozesse des Stoffwechsels der Pilzzelle (Tietz und Sterry, 2002a). Ein weiterer Angriffspunkt ist die Chitin-Biosynthese, woraus Defekte beim Zellwandaufbau resultieren.

Griseofulvin wirkt, betrachtet man die häufigsten Erreger der Onychomykose, nur bei *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*)-Infektionen und muss dann kontinuierlich jeden Tag gegeben werden (übliche Dosis 500 mg/d am besten verteilt auf zwei Dosen) (Tietz, 2001b). Als Monotherapie hat es eine geringere Ansprechrate und wird daher heute seltener angewandt (Lecha et al., 2005). Gemeinsam mit adjuvanten Maßnahmen (Seebacher und Brasch, 2006) und in Kombination mit topischer Applikation von Amorolfin werden deutlich bessere Ergebnisse erzielt (Baran und Koukhov, 2005).

Als unerwünschte Arzneimittelwirkung ist vor allem die Beeinträchtigung anderer Medikamente zu nennen, da Griseofulvin hepatisch über ein Cytochrom-P450-Enzym metabolisiert wird und damit den Abbau anderer Medikamente beeinträchtigen kann. Da es sich bei der Onychomykose um eine Krankheit des höheren Alters handelt und bei Diabetikern oder vorerkrankten Patienten allgemein häufiger vorkommt, ist auf die Wechselwirkungen mit einer oft vorhandenen Dauermedikation besonders zu achten. Des Weiteren kommen gastrointestinale Beschwerden, allergische Reaktionen sowie Störungen des Zentralnervensystems vor (Karow und Lang-Roth, 2006).

Die Azole **Fluconazol** und **Itraconazol** haben einen deutlich breiteren Einsatzbereich. Sie wirken beide auf *T. rubrum*, *C. albicans* und *C. parapsilosis*. Itraconazol wirkt auch bei einer Infektion mit *Scopulariopsis brevicaulis* (*S. brevicaulis*) und teilweise auf *T. interdigitale* (Tietz, 2001b).

Vom Wirkmechanismus her sind beide gleich, sie greifen auf dem Niveau des bereits synthetisierten Lanosterol in die Ergosterolsynthese ein. Unterschiede zwischen den beiden Azolen ergeben sich durch ihre zusätzliche Wirkung auf die Fettsäuresynthese und andere Kofaktoren.

Itraconazol gibt man als Pulstherapie, d. h. eine Woche zweimal täglich zwei Kapseln von 200 mg/d, dann drei Wochen Pause. Dieses Schema wiederholt man in der Regel dreimal; eine längere Behandlungsdauer wird aus toxikologischen Gründen nicht empfohlen (Seebacher und Brasch, 2006).

Fluconazol wird in der Regel gut vertragen. Einmal pro Woche werden 150 oder 300 mg eingenommen. Hier gibt es keine Beschränkung der Behandlungsdauer; es wird empfohlen, die Therapie bis zur Heilung fortzusetzen, d. h. zwischen 5 und 12 Monaten.

Auch die Azole interagieren mit dem Cytochrom-P-450-System und bedingen somit zahlreiche Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten. Beispielsweise wird der Substratspiegel von Sulfonlharnstoffen im Blut erhöht, was zu einer Wirkungsverstärkung des Pharmakons und damit zu einer verstärkten Hypoglykamieneigung führen kann. Seltener kommt es zu Transaminase-

nerhöhungen bis hin zur Hepatitis. Eine häufige Nebenwirkung stellen gastrointestinale Beschwerden wie zum Beispiel Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö dar (Karow und Lang-Roth, 2006).

**Terbinafin** gehört zu den Allylaminen und wirkt bei fast allen häufigen Erregern der Onychomykose (*T. rubrum*, *T. interdigitale*, *C. parapsilosis*, *S. brevicaulis*) (Schmid-Wendter, 2006). Lediglich die Wirkung gegenüber *C. albicans* ist eingeschränkt. Ähnlich wie die Azole greifen auch die Allylamine in die Ergosterolsynthese ein, allerdings schon in einen früheren Reaktionsschritt, nämlich an der Squalenepoxidase.

Die Behandlung mit diesem Wirkstoff erfordert eine tägliche Einnahme von 250 mg über normalerweise drei Monate, wobei bei Befall des Großzehennagels eine Verlängerung der Therapie erforderlich sein kann (Tietz, 2001b).

Im Gegensatz zu den Azolen führt Terbinafin nicht zu einer Hemmung oder Induktion der Clearance von Arzneimitteln, die über das Cytochrom-P-450-System metabolisiert werden, und ist damit vor allem für die Behandlung multimorbider Patienten besonders geeignet. Allerdings beschleunigt z. B. Rifampicin die Plasma-Clearance von Terbinafin, Cimetidin und andere Cytochrom-P-450-Inhibitoren reduzieren die Plasma-Clearance des Medikamentes. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind vor allem in Form von gastrointestinalen Beschwerden zu beobachten, selten kommen Kopfschmerzen und in Einzelfällen Veränderungen des Blutbildes vor (Tietz und Sterry, 2002b).

Allgemein ist darauf zu achten, ob der Nagel weiter wächst. Sollte das Herauswachsen des gesunden Nagels sistieren oder sich die Infektion nach proximal ausdehnen, sollte umgehend eine weitere Behandlung, am besten mit einem anderen Antimykotikum, begonnen werden.

Handelt es sich bei der Form der Onychomykose um eine Onychia et Paronychia candidosa, dann therapiert man mit hefewirksamen Medikamenten wie Fluconazol oder Itraconazol, allerdings in diesem Fall als kontinuierliche Gabe bis zur Heilung.

Für die sehr selten vorkommenden Onychomykosen im Kindesalter ist bisher nur das Griseofulvin in gewichtsadaptierter Dosierung für die Therapie zugelassen.

### Probleme bei der Behandlung:

Ziel einer Behandlung der Onychomykose sind pilzfreie, klinisch gesunde Nägel. Hierbei ist die mykologische Heilung über einen negativen Kulturbefund klar definiert, die klinische Heilung dagegen wird von Autor zu Autor unterschiedlich ausgelegt. Für letztere wird studienabhängig ein klinisch unauffälliger Anteil der Nagelplatte zwischen 80 und 100 % gefordert, so dass ein Vergleich von Untersuchungsergebnissen bezüglich der Heilungsraten schwierig ist. Allgemein anerkannt ist allerdings, dass keine Onycholyse, Hyperkeratose, Paronychie und Dyschromasie vorliegen dürfen (Lecha et al., 2005).

Ein weiteres Problem ist das häufige Vorkommen von Rezidiven, da oftmals Pilzsporen im Nagel verbleiben. Vor allem die subungualen Hyperkeratosen enthalten luftgefüllte Hohlräume, die ein ideales Reservoir für Pilzsporen bilden. Um Rezidive aus diesen Quellen zu vermeiden, ist die oben genannte atraumatische Entfernung der erkrankten Nagelbereiche sowie der Hyperkeratosen unabdingbar. Zusätzlich ist es – wie bereits erwähnt – hilfreich, eine Kombinationstherapie zu wählen (Elewski, 1998) und die topische Therapie auch nach vollständiger Ausheilung intermittierend über einen längeren Zeitraum als Prophylaxe weiterzuführen (Haneke, 1993).

Hinzu kommt die Vorbeugung einer Reinfektion durch die Aufklärung über richtiges Verhalten an Orten mit Ansteckungsgefahr, Elimination der Keime in der eigenen Umgebung und Reduzierung der eigenen Risikofaktoren.

Ein weiterer möglicher Grund für Rückfälle ist eine Reinfektion des Nagels aus einer weiterbestehenden Tinea manum oder pedum, die daher immer konsequent mitbehandelt werden muss (Haneke, 1993).

Allgemein ist die Patienten-Compliance bei der Behandlung einer Onychomykose problematisch, denn die langen Behandlungszeiträume, mögliche unerwünschte Wirkungen der systemischen Antimykotika sowie die mühsame topische Behandlung des betroffenen Nagels vermindern die Kooperationsbereitschaft der Patienten. Besonders älteren Menschen fällt es aufgrund der oft verminderten Beweglichkeit unter Umständen schwer, täglich die Nägel mit Feile und Nagellack zu behandeln. Häufig beenden Patienten auch die Therapie, sobald der Nagel wieder normal aussieht, ohne ihn auf Pilzfreiheit untersuchen zu lassen. Ein gutes Arzt-Patienten-Verhältnis und eine ausführliche Aufklärung über die Notwendigkeit der Therapie sowie eine realistische Einschätzung der Heilungschancen können hier hilfreich sein.

Gupta und Linh fassen die Hauptkomponenten zur Verbesserung der Therapieeffizienz der Onychomykose wie folgt zusammen:

1. Eindeutige Diagnose der Onychomykose und Unterscheidung von anderen Ursachen der Nageldystrophie.
2. Identifizierung von Besonderheiten des Nagels, die den Behandlungserfolg beeinträchtigen könnten.
3. Erkennen von Charakteristika des Patienten, die den Behandlungserfolg beeinträchtigen könnten.

**Tabelle 4: Verbesserung der Therapieeffizienz bei der Onychomykose (Gupta und Linh, 2006a)**

### ***3.3 Fragestellung der Arbeit***

Der derzeitige Goldstandard in der Diagnostik der Onychomykose ist die Kombination von Nativuntersuchung und Kulturbefund. Konkurrierend bzw. gleichzeitig wird die histologische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate von Nagelspänen eingesetzt. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Sensitivität aller drei Verfahren am Patientenkollektiv der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie im Zeitraum von 2000 bis 2006 zu untersuchen und ihre diagnostische Aussagekraft miteinander zu vergleichen. Dadurch soll die Frage beantwortet werden, inwieweit eine zusätzliche histologische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate von Nagelspänen hinsichtlich einer sicheren Diagnosestellung der Onychomykose von Relevanz ist.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

In die Arbeit gingen Auszüge aus zwei verschiedenen Datenbanken der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universität Bonn ein:

1. die Datenbank der histologischen Untersuchungen für die PAS-gefärbten Schnittpräparate von Nagelspänen
2. die Datenbank der Mykologie für die mikroskopischen Befunde des Nativpräparates und für den Kulturbefund

Hinzu kamen die Informationen aus den retrospektiv aufgearbeiteten Akten von 631 Patienten.

Daten	Anzahl
Histologie – Datenbank	Ca. 38000 Einträge, davon 1400 Onychom.
Mykologie – Datenbank	Ca. 36000 Einträge
Patientenakten der Onychomykose-Positiven	631 (davon 435 gemäß Fragestellung dokumentiert)
Nachuntersuchung Hefen	29 Präparate

**Tabelle 5: Datenpool der Arbeit**

#### 4.1.1 Datenbank der Abteilung Dermatohistologie

Die Datenbank der histologischen Untersuchung der Abteilung Dermatohistologie der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität Bonn enthielt im Zeitraum 2000 bis 2006 ca. 38000 Einträge. Diese wurde zunächst nach dem Schlagwort Onychomykose und dem entsprechenden ICD-10-Schlüssel durchsucht. Es wurden 1 400 Einträge aufgerufen, die jeweils das Ergebnis einer mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate von Nagelspänen enthielten.

#### 4.1.2 Datenbank der Mykologie

Die Datenbank der Mykologie verzeichnete im genannten Zeitraum ca. 36000 Einträge. Diese waren Ergebnisse jeglicher Art von mykologischer Untersuchung: Abstriche aus Wunden, Abklatschpräparate und auch Nagelspäne.

### **4.1.3 Daten aus der retrospektiven Aufarbeitung der Patientenakten**

Anschließend wurden die Akten der in die Untersuchung aufgenommenen Patienten aus den Archiven der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie daraufhin untersucht, ob der Patient vor der Entnahme der Proben lokal oder systemisch antimykotisch vorbehandelt worden war. Dies ist von Bedeutung, weil in diesen Fällen das Ergebnis der Kultur häufig falsch-negativ ausfallen kann. Dabei wurden die 435 Fälle berücksichtigt, bei denen der Verlauf hinsichtlich der Nagelpilzerkrankung vollständig dokumentiert war.

### **4.1.4 Nachuntersuchung Hefen**

Zuletzt wurden einige PAS-gefärbte Präparate nachuntersucht. Und zwar diejenigen Fälle mit einem Hefenachweis in der Kultur und einem positiven Ergebnis in der mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate oder Nativbefund. Wir überprüften, ob in den histologischen Präparaten Dermatophyten oder tatsächlich hefeähnliche Pilzelemente nachweisbar waren. Dies ist daher von Interesse, weil die Hefen genaugenommen eine Sonderstellung in der Erregerdiagnostik der Onychomykose einnehmen. Sie kommen oft auch als Kontamination durch körpereigene Flora oder Anflugskeime vor. Daher wurden schon primär nur die Fälle als Onychomykose negativ gewertet, in denen – zusätzlich zum Vermerk „Hefen“ in der Kulturbeurteilung – mindestens ein anderes Verfahren ebenfalls ein positives Ergebnis aufwies. Die Kultur wurde immer als negativ gewertet, wenn nur Hefen gewachsen waren. Denn nach Einsicht der Patientenakten wurde deutlich, dass ein reiner Hefenachweis in der Kultur ohne Hinweis auf Pilze in der Mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate oder dem Nativbefund keine therapeutischen Konsequenzen hatte.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Abgleich der Datenbanken

Zunächst wurden die beiden Datenbanken alphabetisch sortiert und Eintrag für Eintrag miteinander verglichen.

Anhand von Name, Vorname und Geburtsdatum des Patienten sowie Entnahmedatum und Entnahmeort der Probe wurde überprüft, ob die Nagelprobe eines Patienten mittels aller drei Diagnoseverfahren analysiert worden war. Nur wenn die genannten Bedingungen erfüllt waren, wurde der Patient in die Untersuchung aufgenommen. Um die Resultate der jeweiligen Untersuchungen schnell erfassen zu können, wurden diese mit „1“ für ein positives Ergebnis und „0“ für ein negatives Ergebnis kodiert.

Die Schnittmenge beider Datenbanken betrug 1146 Proben, welche mittels aller drei Testverfahren – Nativbefund, Kultur und Mikroskopischer Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate – analysiert worden sind.

Ebenfalls in diesem Durchgang wurden die Erreger der Onychomykose erfasst und in der Spalte „Kultur Bemerkungen“ notiert.

Für die Bewertung der verschiedenen Diagnoseverfahren ist auch der Zeitaufwand eines Diagnoseverfahrens wichtig; daher wurde auch die Dauer vom Eingang des Präparates bis zum Befundresultat notiert.

### 4.2.2 Erfassung der Ergebnisse

Anschließend begann die Auswertung der Ergebnisse. Dazu diente folgende Tabelle:

Gruppe	Nativbefund	Kulturbefund	PAS - Befund
<b>0</b>	0	0	0
<b>A</b>	1	0	0
<b>B</b>	1	1	0
<b>C</b>	1	1	1
<b>D</b>	0	1	1
<b>E</b>	0	0	1
<b>F</b>	0	1	0
<b>G</b>	1	0	1

Tabelle 6: Auswertungsschema für die Ergebnisse von Nativ-, Kultur- und PAS-Befund 0=negativ, 1=positiv.

Die Patienten, von denen die Nagelproben stammen, sind alle in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universitätsklinik Bonn untersucht worden (größtenteils in der Privatambulanz, aber auch in der Allgemeinen Ambulanz sowie auf den verschiedenen Stationen). Bei der Zusammenstellung des Patientenkollektivs wurden die Untersuchten mit dystrophischen Nägeln im Beobachtungszeitraum 2000 bis 2006 konsekutiv, also nicht vorgefiltert, in die Untersuchung aufgenommen. Alle klinisch auffallenden Nagelveränderungen wurden sowohl mykologisch als auch histologisch auf Pilze hin untersucht, dabei wurden teilweise auch von mehreren Nägeln eines Patienten Proben entnommen. Somit ergaben sich 1146 Proben von 851 Patienten.

### **4.2.3 Statistische Auswertung**

Anhand der erhobenen Daten lassen sich sowohl Aussagen zur Anzahl der Fälle mit positivem Pilznachweis insgesamt machen, als auch zur Anzahl der Fälle, die nur von einem oder einer Kombination verschiedener Verfahren erkannt wurden. Als Proben mit positivem Ergebnis wurden diejenigen gewertet, welche in mindestens einem Diagnoseverfahren einen positiven Befund aufwiesen. Damit sind 631 der untersuchten Proben positiv für die Onychomykose, bei den übrigen 515 gibt es eine andere Ursache für die Nagelveränderung.

Zusätzlich erfolgte die Berechnung des Alters der untersuchten Personen sowie die Kodierung des Geschlechts mit „f“ für Frauen und „m“ für Männer.

Um auch die Erregerdiagnose quantifizierbar zu machen, wurden diese mittels Buchstaben kodiert und die Häufigkeit des Vorkommens ermittelt.

Des Weiteren wurden die Angaben zum Entnahmeort dahingehend ausgewertet, wie oft die Finger- im Vergleich zu den Fußnägeln betroffen waren. So konnte auch die prozentuale Verteilung der Erreger auf Hände und Füße analysiert werden.

Anhand der beim ersten Durchgang eingetragenen Daten zur Kulturdauer wurde zudem die mittlere Kulturdauer berechnet.

Neben der Zeit, die ein Verfahren bis zur Beurteilung des Ergebnisses in Anspruch nimmt, sind auch die Kosten für die Testmethoden im Hinblick auf die Praxistauglichkeit von Interesse. Unsere Berechnungen orientieren sich an der Gebührenordnung für Ärzte.

#### **4.2.4 Methodik der unterschiedlichen Diagnoseverfahren**

Um die in der vorliegenden Analyse verwerteten Ergebnisse zu erhalten, müssen die veränderten Nägel nach einem einheitlichen Schema untersucht werden. Diese „Standard Operating Procedure“ (SOP) der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universität Bonn wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

Die korrekte Diagnose einer Veränderung des Nagels ist für eine erfolgreiche Therapie unerlässlich und setzt sich aus fünf Schritten zusammen:

1. Die klinische Inspektion und Anamnese
2. Die korrekte Materialentnahme
3. Die Nativ-Mikroskopie des entnommenen Nagelmaterials
4. Die kulturelle Anzucht des Erregers aus dem Untersuchungsmaterial
5. Die Identifizierung des Erregers auf Speziesniveau
6. Die mikroskopische Untersuchung des Materials nach Einbettung und PAS-Färbung

##### **4.2.4.1 Klinische Inspektion und Anamnese**

Die klinische Untersuchung und die Anamnese gehen jeglichen weiteren Maßnahmen voraus und helfen – zusammen mit den nachfolgenden Untersuchungen –, die Diagnose zu stellen. Oft fällt ein veränderter Nagel bei einer klinischen Untersuchung als Nebenbefund auf, da viele Menschen nicht allein deswegen zum Arzt gehen. Schon klinisch erkennbare Befunde können auf eine Dermatophyten-Infektion hindeuten. Allerdings wird nur etwa die Hälfte aller Nageldystrophien tatsächlich von Pilzen hervorgerufen, daher ist eine angemessene Labordiagnostik von großer Bedeutung (Elewski, 1998; Weinberg et al., 2003). Trotzdem hat die klinische Untersuchung eine hohe Sensitivität und Spezifität (Burzykowski et al., 2003).

Rein klinisch lässt sich beispielsweise aus der farblichen Veränderung vermuten, ob eine bakterielle Infektion oder Superinfektion vorliegt (z.B. *Pseudomonas aeruginosa* – Grünfärbung). Eine

Rötung des Nagelbettes hingegen weist auf eine Paronychie mit Beteiligung der Nagelplatte hin, wie sie z. B. bei chronischen *Candida*-Infektionen vorkommt (s. S. 16).

#### 4.2.4.2 Materialentnahme

Für alle weiteren diagnostischen Schritte ist die korrekte Materialentnahme die Basis und somit wichtigstes Glied in der Kette (Mehregan et al., 1997).

Der Entnahmeort genau wie die Art der Instrumente und die Menge des gewonnenen Materials spielen eine entscheidende Rolle.

Zunächst muss das zerstörte Nagelgewebe mit Schere, Skalpell, scharfem Löffel oder Fräse weitgehend entfernt werden. Anschließend wird der Nagel mit 70 %igem Alkohol kurz desinfiziert, um die Entnahmestelle von Anflugskeimen zu reinigen. Soll eine histologische Untersuchung folgen, so wird für diese ein größeres, komplettes Nagelstück mit der Zange abgeschnitten.

Schließlich wird die Übergangsstelle zwischen pilzbefallener und vermutlich noch gesunder Nagelplatte aufgesucht, und dort werden mit einem Skalpell vorsichtig feine Späne für die mykologische Untersuchung abgeschabt.

Die optimale Entnahmestelle ist zudem von der Form der Onychomykose abhängig. Bei der distalen subungualen Onychomykose gilt der subunguale Debris als ideales Material, während bei der proximalen subungualen Onychomykose das infektiöse weißliche Material in den tieferen Nagelschichten zu finden ist. Für die superfizielle weiße Onychomykose ist es ausreichend, den oberflächlichen weißlichen Belag abzuschaben (Suarez et al., 1991).

Da die Pilze in Nestern auftreten und sie daher oft nicht in jedem Nagelstück nachzuweisen sind, ist es wichtig, möglichst viele Späne zu gewinnen. Die ersten Nagelspäne sollten verworfen werden, da hier die Verunreinigung mit Anflugskeimen am häufigsten ist. Zum Auffangen der Probe werden sterile Petrischalen aus Glas verwendet.

Generell sollten die zu untersuchenden Nagelbestandteile für die mykologische Diagnostik möglichst klein bzw. feinspänig sein, da diese im Nativpräparat durch die Chemikalien (z.B. Kalilauge) besser aufgeschlossen werden. Auch auf Nährböden wachsen die Erreger aus diesen Proben leichter und die Ausbeute der Kultur ist größer. Wenn die entnommenen Nagelspäne relativ groß sind, sollten sie vor der weiteren Untersuchung zerkleinert werden. Außerdem muss ausreichend

Material entnommen werden, denn je größer die Menge an Nagelspänen, desto größer ist auch die Chance einer richtigen Diagnose (Ellis, 1999).



**Abbildung 3: Materialentnahme im Bild**

#### 4.2.4.3 Nativbefund

Die Mikroskopie ist ein sehr sensitives Verfahren und gibt einen ersten Hinweis darauf, ob eine Mykose vorliegt oder nicht. Bei einer Infektion mit Dermatophyten kann aufgrund der starken Myzelbildung in vielen Fällen sogar schon während der Erstvorstellung ohne lange Wartezeit auf den Befund die Diagnose mikroskopisch gesichert werden (Tietz, 2001c).

##### Technik:

Das Untersuchungsmaterial wird mit einer ausgeglühten Pinzette auf einen Objektträger überführt. Im Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universität Bonn wird es dann mit 20 %iger Tetraethylammoniumhydroxid Lösung (TEAH-Lösung der Firma Merck) versetzt, mit einem Deckgläschen überschichtet und ca. 10 - 20 Minuten in einer „feuchten Kammer“ stehen gelassen. Bei einer „feuchten Kammer“ handelt es sich um einen Glasquader, dessen Boden mit Wasser bedeckt ist, um ein Austrocknen der TEAH-Lösung zu verhindern. Durch die wässrige Lösung des TEAH wird das Keratin der Wirtszelle zerstört, während die chitinhaltigen Strukturen der Pilze erhalten bleiben, so dass diese mikroskopisch darstellbar werden. Danach werden die Proben lichtmikroskopisch bei 25facher Vergrößerung analysiert.

Charakteristisch für eine Pilzinfektion ist der Nachweis von Hyphen und evtl. auch Sporen im Nativpräparat, wobei die Zuordnung zu einer Pilzgattung mikroskopisch in der Regel nicht möglich ist (Gupta und Ricci, 2006).

#### 4.2.4.4 Pilzkultur

Die Pilzkultur ist das zweite Standbein der mykologischen Diagnostik und ergänzt die Mikroskopie, denn bei der Untersuchung des Nativpräparates kann nur festgestellt werden, ob eine Mykose möglicherweise die Ursache für die Nagelzerstörung darstellt. Die Frage zu beantworten, ob es sich um humanpathogene Pilze handelt und ob diese vermehrungsfähig sind, bleibt der Analyse der Kulturbefunde vorbehalten.

Die Differenzierung zwischen Kontamination und Infektion mit pathogenen Keimen ist nur per Kultur möglich.

##### Technik:

Pilze wachsen auf vielen Nährmedien und in einem breiten pH-Bereich.

Spezielle Pilznährmedien (Sabouraud-Glucose- und Kimmig-Agar) haben einen niedrigen pH, um Pilzen einen Vorteil gegenüber Bakterien zu gewähren. Wichtigste Voraussetzung für das Wachstum von Pilzen ist das Vorhandensein von Kohlenstoff und Stickstoff, daher ist meist Pepton als Nährstoffquelle im Agar enthalten, welches die für Pilze essenziellen Stoffe freisetzt.

Im Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universitätsklinik Bonn wird überwiegend ein Mykoselagar verwendet, welcher sich wie folgt zusammensetzt:

Extrakt aus Sojabohnenmehl	10,0g
Dextrose	10,0g
Agar	15,5g
Cycloheximid	0,4g
Chloramphenicol	0,05g
pH	6,9 +/- 0,2

**Tabelle 7: Zusammensetzung des Mykoselagar**

In sterilisierten Petrischalen, die mit einem ebenfalls sterilen Glasdeckel abgedeckt sind, werden die Nagelproben ins Labor transportiert. Das möglichst feinspänige Material wird mit einer ausgeglühten Pinzette in das Nährmedium eingebracht.

Bei dem in der Dermatologie entnommenen Material ist immer mit einem Wachstum von allen drei Pilzarten (Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilzen) zu rechnen, allein schon aufgrund von nicht vollständig zu vermeidenden Verunreinigungen durch die körpereigene Flora und Anflugskeime. Daher ist dem Mykoselagar Cycloheximid zugesetzt, was das recht anfällige Wachstum der Dermatophyten gegenüber evtl. vorhandenen kontaminierenden, schnell wachsenden Schimmelpilzen schützt. Außerdem hemmt dieser Zusatz auch noch einige Hefen wie z.B. *Candida parapsilosis*. Das ebenfalls enthaltene Chloramphenicol unterdrückt das Wachstum eventuell eingebrachter Bakterien.

Die beimpften Agarschalen werden mit Parafilm verschlossen und anschließend beschriftet. Nun werden sie bei Raumtemperatur (nicht höher als 28°C für Dermatophyten (Qadripur SA, 1996)) in einem dunklen Schrank bebrütet und wöchentlich makroskopisch auf Pilzwachstum hin kontrolliert.

Ist eine Kolonie sichtbar, so wird aus dieser mittels Tesafilm eine Probe auf einen Objektträger mit einem Tropfen Lactophenol Blau (Merck) übertragen. Den Farbstoff lässt man einige Minuten einwirken, danach kann das Präparat unter dem Mikroskop betrachtet werden. Man sucht nach Hyphen, Sporen, Makro- und Mikrokonidien, die jeweils für einen bestimmten Dermatophyten charakteristische Formen aufweisen. Die mikroskopische Speziesidentifizierung erfordert viel Erfahrung und ist damit sehr untersucherabhängig.

#### Speziesidentifizierung (siehe auch nachfolgende Abbildung):

Für die Dermatophyten und Schimmelpilze ist eine Orientierung an charakteristischen makromorphologischen (Farbe, Konfiguration und Wachstumsgeschwindigkeit) und mikromorphologischen (Hyphenform, Makro- und Mikrokonidien, Chlamydosporen) Kriterien möglich. Für einige Pilzarten gibt es die Möglichkeit, spezielle Nährmedien einzusetzen und damit das Vorhandensein einer Spezies nachzuweisen (z. B. der Kartoffel-Glucose-Agar auf dem das Wachstum von *T. rubrum* zu einer charakteristischen Rotfärbung führt – siehe nachfolgende Abbildung – oder

Harnstoff-Agar zum Nachweis der Harnstoffspaltung von *T. interdigitale*). Als ultima ratio bei besonders schwierigen Fällen bleibt die Differenzierung über PCR, Flow-Zytometrie, Immunohistochemie oder DNS-Fingerprinting in einem Speziallabor (Piérard et al., 1996).

Der Kartoffel-Glucose-Agar besteht aus:

Kartoffelextrakt	4,0g
Glukose	20,0g
Agar	17,0g
pH	5,60 +/- 0,2

**Tabelle 8: Zusammensetzung des Kartoffel-Glucose-Agar**

Auch für Hefen, speziell für *Candida*, gibt es Selektivmedien, z. B. den CandiSelect 4 Agar (Firma BioRad Laboratories), der zwischen *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. tropicalis* unterscheidet. Ebenfalls für Hefen bietet sich der Reis-Agar an. Die fragliche Kolonie wird auf diesen überimpft und der Auftragungsort mit einem Deckgläschen überschichtet. Wie auch die beimpften CandiSelect Nährböden werden die Reis-Agar Platten im Brutschrank bei 37°C bebrütet und nach 24 - 48 h direkt unter dem Mikroskop auf die charakteristischen Hefestrukturen untersucht (siehe nachfolgende Abbildung).

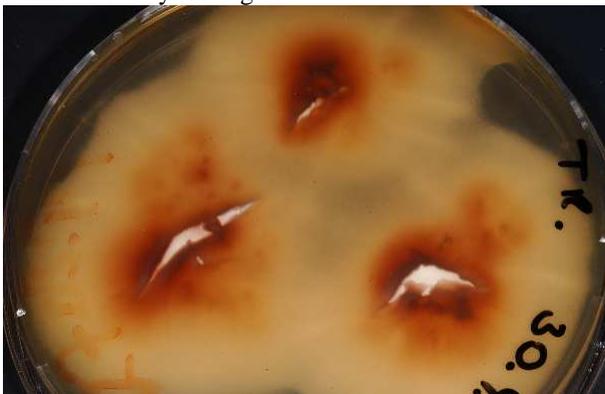
Letztlich ergibt sich die Spezieszuordnung aus der Zusammenschau aller makro- und mikroskopisch erhobenen Befunde.



*T. rubrum* - Mykoselagar



*T. rubrum* - Kartoffel-Glukose-Agar



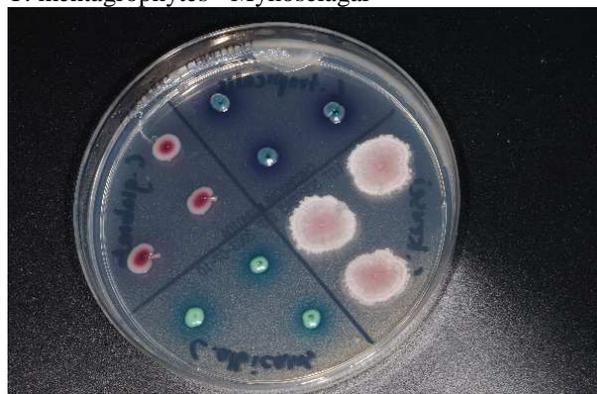
*T. rubrum* - Kartoffel-Glukose-Agar Boden



*T. mentagrophytes* - Mykoselagar



*Epidermophyton floccosum* - Mykoselagar



Hefe auf Reisagar

**Abbildung 4: Beispiele für die Speziesidentifizierung – *T. rubrum* auf verschiedenen Agarsorten, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* auf Mykoselagar, Hefedifferenzierung auf Reisagar.**

#### 4.2.4.5 Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate

Wie eingangs bereits erläutert, gehört die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate von Nagelspänen bisher nicht zur Routinediagnostik bei dem Verdacht auf eine Onychomykose. Bei der Nagelpilzdiagnostik wird sie vor allem in Zweifelsfällen eingesetzt, wenn trotz negativen Nativbefundes und ebensolcher Kultur klinisch der Verdacht auf eine Nagelmykose weiter besteht. Oder eben in den Fällen, in denen absehbar ist, dass die kulturelle Anzucht Probleme bereiten wird, wie z. B. bei bereits antimykotisch vorbehandelten Zehennägeln (Seebacher und Brasch, 2006).

##### Färbetechniken:

Für die mykologische Diagnostik sind spezielle Pilzfärbungen notwendig, wie die **Perjod-Schiff-Säure**-Reaktion (PAS = periodic acid-Schiff reaction), die **Gridley-fungus**(GF)- und die **Gomori-Methenamin-Silber** (GMS)-Färbung. Alle drei haben ein ähnliches Wirkungsprinzip, bei dem freie Hydroxylgruppen der in den Zellwänden der Pilze vorhandenen Polysaccharide mit den Säuren der Farbstoffe zu Aldehyden oxidiert werden.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde die PAS-Färbung genutzt, die allgemein dem Nachweis von Glykogen, Cellulose, neutralen Mukopolysacchariden sowie Muko- und Glycoproteinen dient, welche man sowohl in Bindegewebsfasern, Basalmembranen und Zellwänden als auch im neutralen Schleim der Magenschleimhaut findet.

Die in dieser Arbeit ausgewerteten histologischen Befunde wurden alle nach PAS-Färbung der Nagelspäne erstellt.

##### Technik der PAS-Färbung:

Die entnommene Probe wird in einen sterilen Behälter mit 4%iger Formalinlösung gegeben, ins Labor geschickt und dort weiter aufbereitet. Nach einer Größenbestimmung – zumindest bei größeren Stücken – wird das Nagelstück in eine Plastikkassette gegeben und in einen Einbettautomaten verbracht. Dort findet über Nacht die Entwässerung statt in Form einer aufsteigenden Alkoholreihe über absoluten Alkohol und Xylol bis zum flüssigen Paraffin.

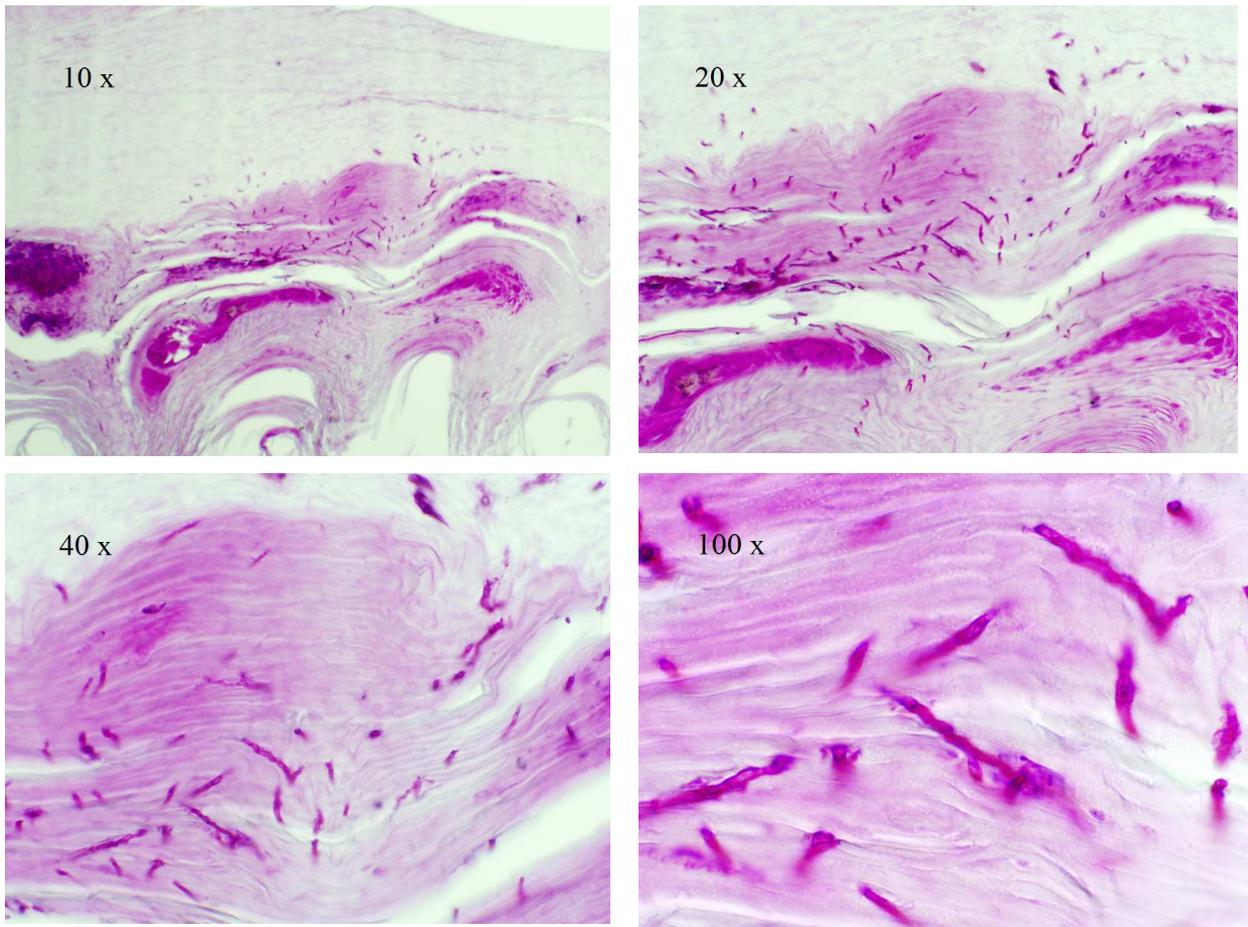
Nun legt man das Nagelstück in ein Metallschälchen, in welches vorher etwas flüssiges Paraffin gefüllt wurde. Als Deckel dient der entsprechende Teil einer Plastikkassette. Das Metallschälchen wird nun auf einer Kälteplatte abgekühlt; dadurch erstarrt das Paraffin und es entsteht ein Block, in dem die Probe eingeschlossen ist.

Dieser Paraffinblock wird im Weiteren in das Mikrotom (Leica RM 2255) eingespannt, mit dem mind. 4 µm dünne Schnitte angefertigt werden können. Diese werden wiederum in einem Wasserbad aufgefangen und von dort aus auf einen Objektträger überführt, auf dem das Präparat dann im Färbeautomat (Medite TST50) weiter bearbeitet werden kann. Bevor schließlich eine automatisierte PAS-Färbung durchgeführt wird, muss das Präparat zunächst mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und damit bindungsfähig für wasserlösliche Farbstoff-Komponenten gemacht werden.

Anschließend laufen folgende Schritte ab:

1. Entnahme der Schnitte aus destilliertem Wasser
2. Inkubation in 0,5 % Perjodsäure (2,5g Perjodsäure Merck 524 + 500ml Ampuwa) für 10-12 min.
3. Wässern in Leitungswasser für 10 min.
4. Schiffs Reagenz (Mischung aus 400ml Merck 9033 und 100ml Sigma 3952016) für 20 min.
5. Wässern in Leitungswasser für 10 min.
6. Mayers Hämalaun (Merck 9249) für 30 s
7. Bläuen in warmem Leitungswasser für 3-5 min.
8. Aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol
9. Eindeckung des Präparates mit Corbitt-Balsam
10. Lichtmikroskopische Untersuchung

Lichtmikroskopisch stellen sich Dermatophyten als PAS-positive Strukturen dar, deren septierte Hyphen oft eine eindeutige Diagnose zulassen. Hefen zeigen das Bild von kleinen runden PAS-positiven Strukturen, wobei hier die Verwechslung mit Sporen möglich ist. Eine Speziesdiagnose gelingt bei Dermatophyten mit dieser Methode nicht (Chandler et al., 1980).



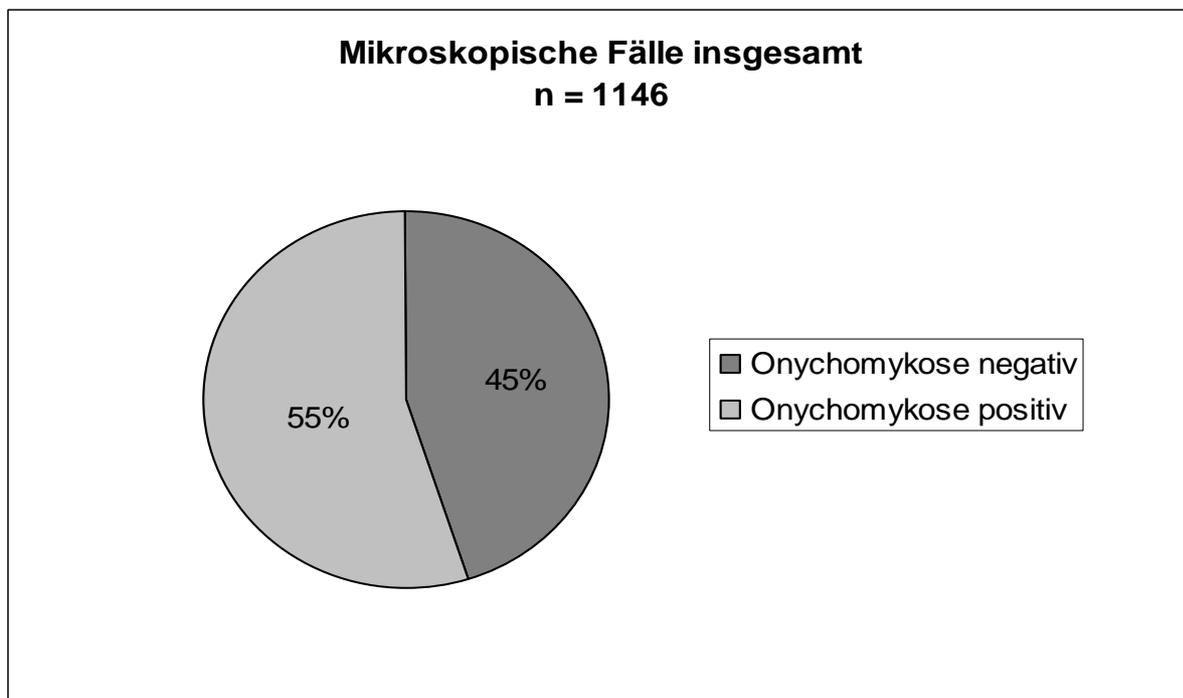
**Abbildung 5: Onychomykose lichtmikroskopisch – Nachweis PAS-positiver Pilzelemente, septierte Hyphen in 10-, 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung inklusive Ölimmersion.**

## 5 Ergebnisse

In der vorliegenden Untersuchung wurden insgesamt 1146 Proben untersucht. Per definitionem liegt in den Fällen eine Onychomykose vor, in denen mindestens eines der angewendeten Verfahren – Nativbefund, Kultur oder Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate – ein positives Ergebnis zeigte (Lawry et al., 2000).

### 5.1 Mikroskopische Fälle insgesamt

In Abbildung 5 ist dargestellt wie viele der 1146 untersuchten Proben gemäß der oben genannten Definition positiv für eine Onychomykose waren und wie viele nicht.



**Abbildung 6:** Anteil der Proben mit positivem und negativem Pilznachweis an der Gesamtzahl der Untersuchten.

Mit 55 % (631 Fälle) überwiegen die Proben mit positivem Pilznachweis gegenüber 45% (515 Fälle) der Untersuchten, bei denen kein Diagnoseverfahren die klinische Differentialdiagnose einer Nagelpilzerkrankung als Ursache der bestehenden Nagelveränderung bestätigen konnte.

## 5.2 Altersverteilung der Patienten, deren Proben einen positiven Pilznachweis zeigten

Auch wenn das Hauptaugenmerk der vorliegenden Untersuchung auf den Diagnoseverfahren der Onychomykose liegt, so sind auch andere Ergebnisse der Datenauswertung von Interesse.

So ist z. B. das Alter der Patienten mit positivem Pilznachweis wie folgt verteilt:

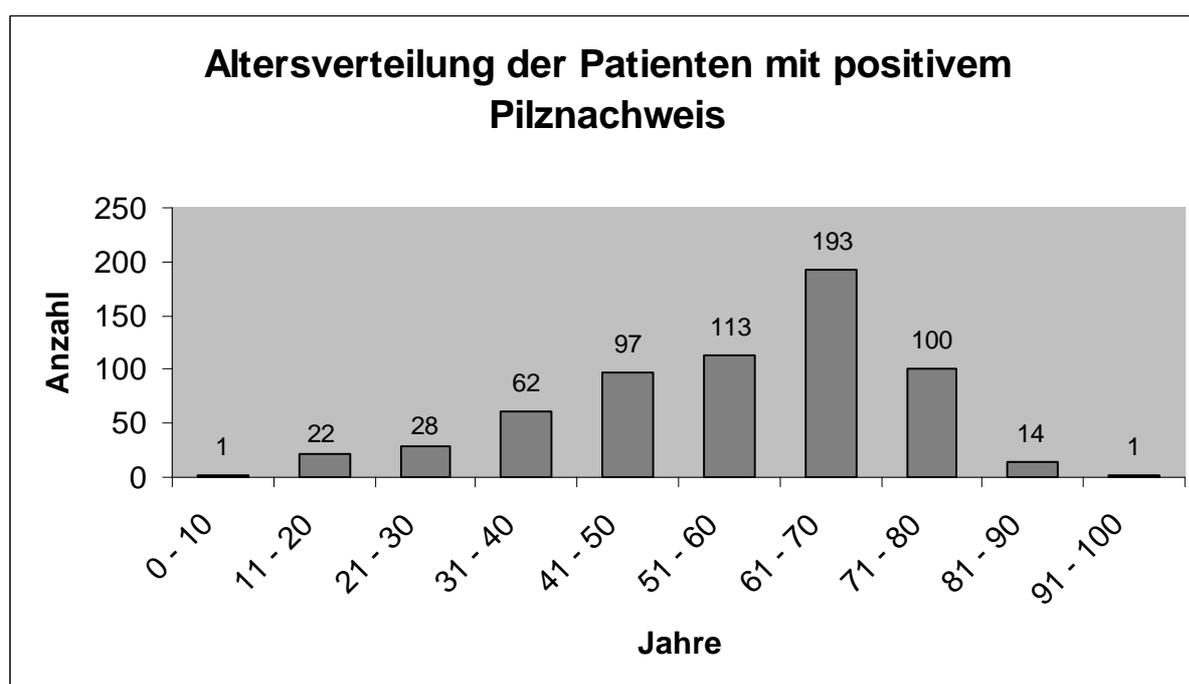


Abbildung 7: Altersverteilung der Patienten mit Proben mit positivem Pilznachweis.

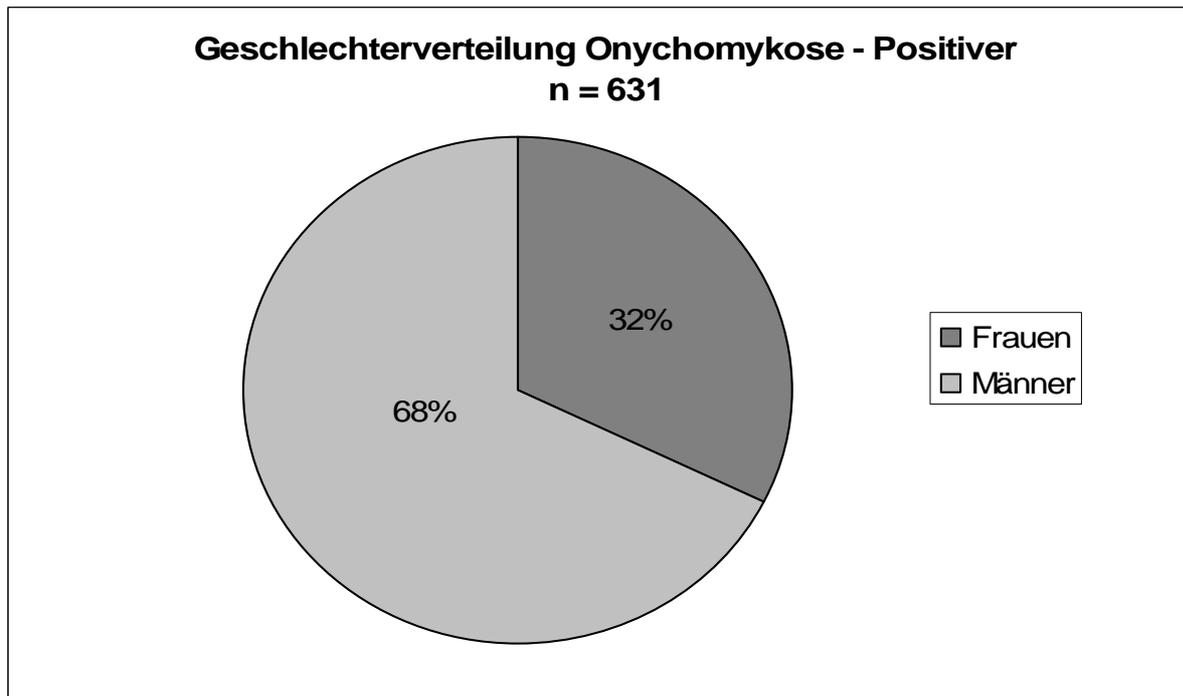
Insgesamt ist aus dem Diagramm ersichtlich, dass eine Onychomykose in den ersten vierzig Lebensjahren relativ selten ist und die Häufigkeit danach zunimmt.

Die meisten Patienten sind zwischen 41 und 80 Jahren alt, im hohen Alter gibt es wieder weniger Erkrankungsfälle. Lediglich 8 % der Patienten sind jünger als 31 Jahre. Zusammengefasst findet sich ein Fünftel der Erkrankungsfälle vor dem 40. und nach dem 80. Lebensjahr, die übrigen vier Fünftel treten im dazwischenliegenden Zeitraum auf. Mit 193 Patienten (31 %), also fast einem Drittel der Betroffenen, ist die Altersgruppe von 61 - 70 Jahren am häufigsten vertreten.

Im Mittel sind die untersuchten Personen mit einem positiven Nachweis für einen Nagelpilz 56 Jahre alt.

### 5.3 Geschlechterverhältnis der Patienten mit Pilznachweis

Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten mit Pilznachweis in der Nagelprobe ist in untenstehender Abbildung visualisiert.



**Abbildung 8:** Verhältnis der männlichen zu den weiblichen Patienten mit Pilznachweis.

In der vorliegenden Untersuchung stammen insgesamt gut zwei Drittel der 631 (428 Untersuchte) positiven Proben von männlichen Patienten und dementsprechend nur etwa ein Drittel (203 Untersuchte) von weiblichen Patienten.

#### 5.4 Erreger der Onychomykose

In der vorliegenden Untersuchung konnte von den 631 Fällen mit positivem Pilznachweis in 365 Fällen ein Erreger eindeutig identifiziert werden. Die erste Grafik zeigt die in der Untersuchung nachgewiesenen Erreger, aufgeteilt in Gruppen nach dem DHS-System.

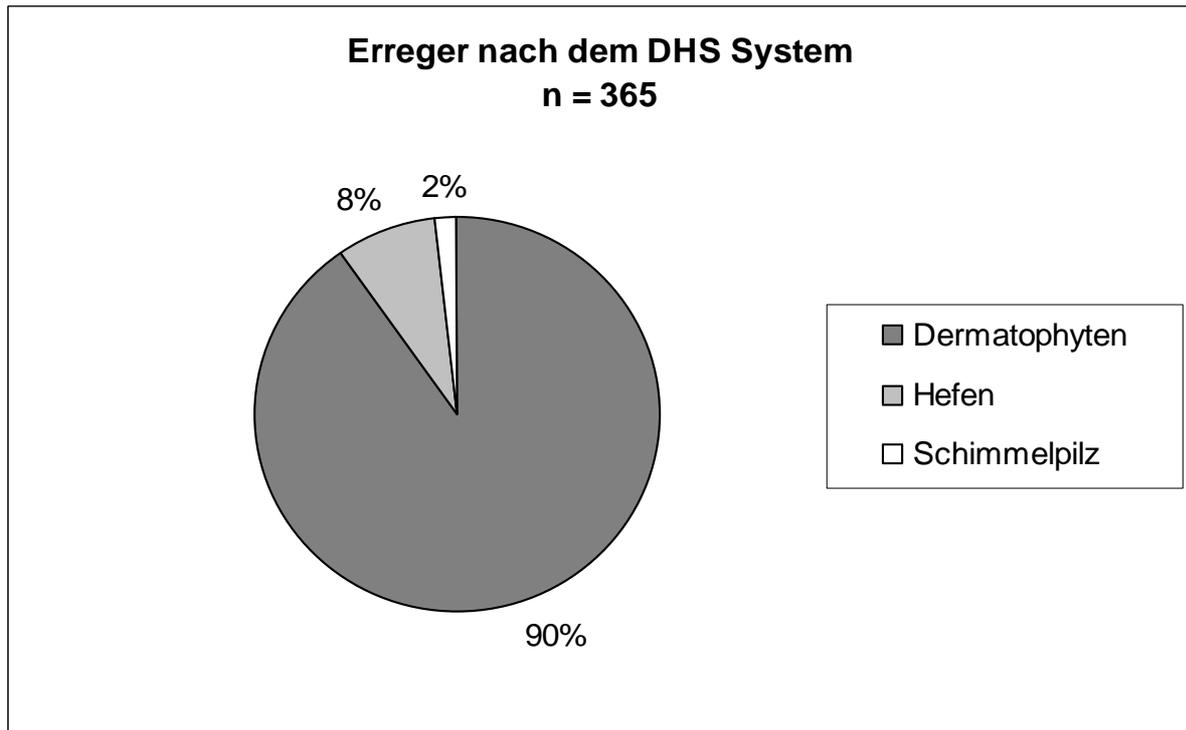
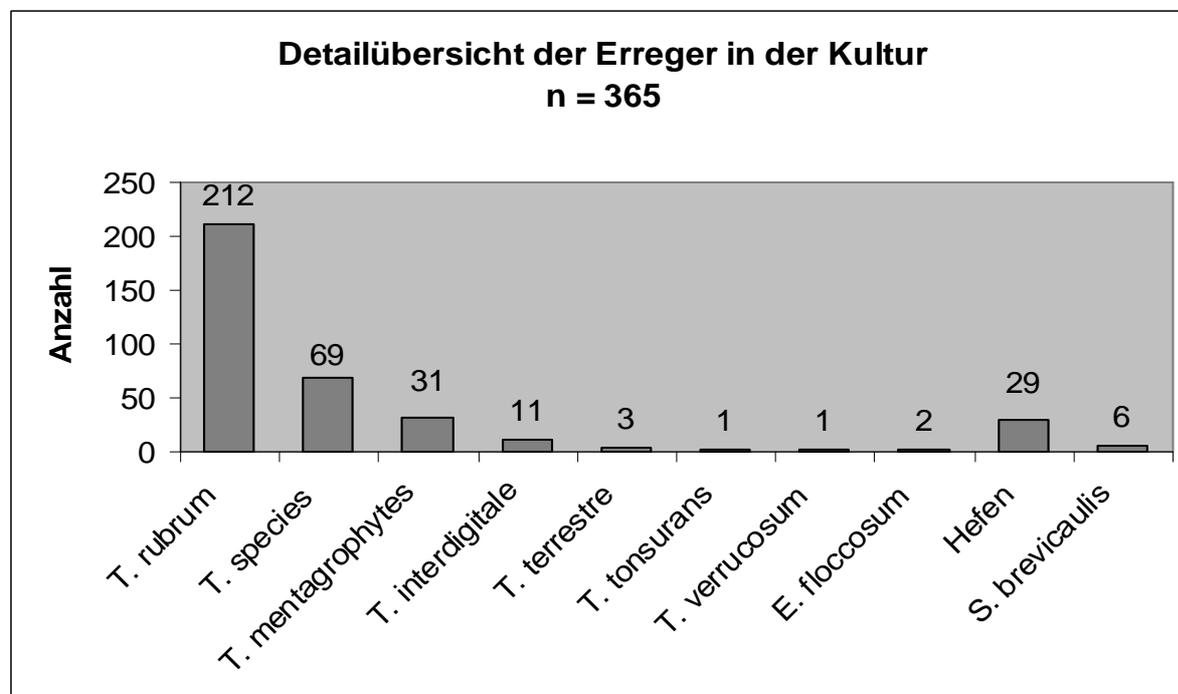


Abbildung 9: Erregernachweis in der Kultur der Proben gruppiert nach dem DHS-System.

Die Dermatophyten stellen mit 90 % die häufigsten Erreger dar. Hefen wurden in 8 % der Fälle in der Kultur nachgewiesen, wobei ihre Rolle in der Ätiologie der Nagelveränderung durch eine mikroskopische Nachuntersuchung der entsprechenden Präparate noch weiter aufgeschlüsselt wird (siehe Punkt 4.8.). Die Schimmelpilze – hier vor allem *Scopulariopsis brevicaulis* – treten mit 2 % der Fälle sehr selten als Erreger der Onychomykose auf.

In der nächsten Abbildung sind diejenigen Erreger, welche im Kulturbefund dokumentiert waren, genauer aufgeschlüsselt.

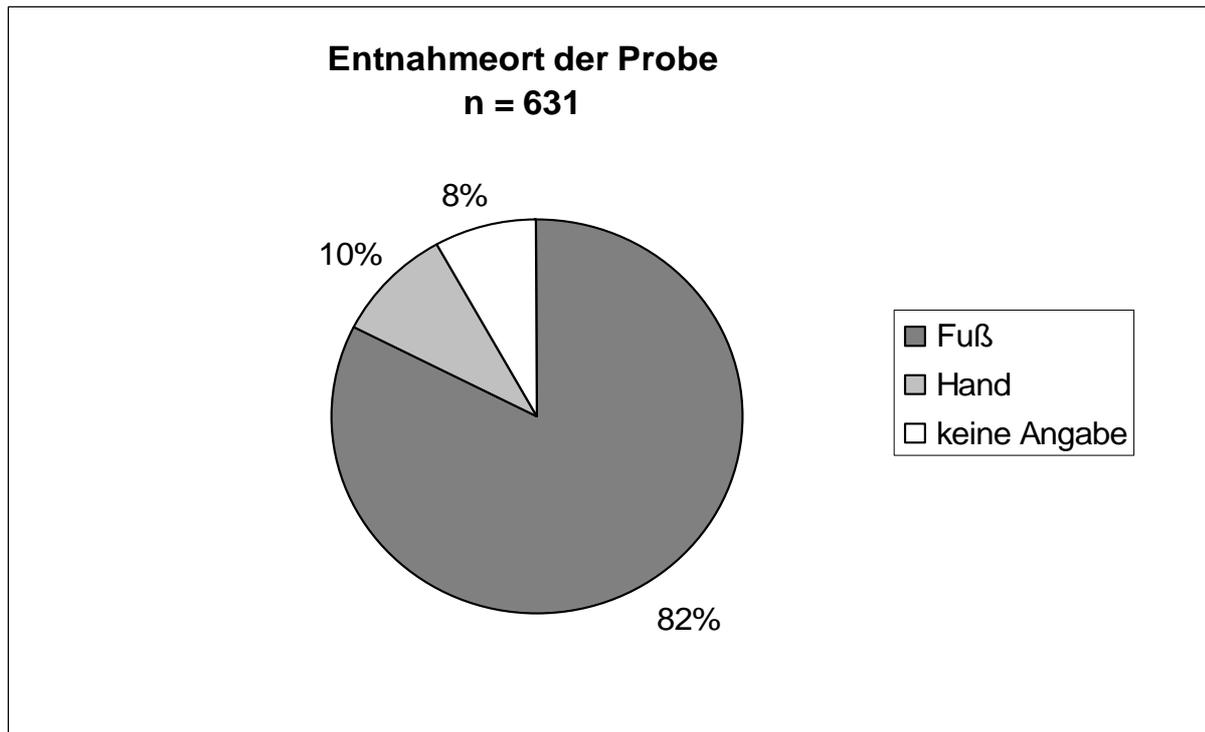


**Abbildung 10: Ausführliche Erregerauswertung der Kulturergebnisse vorliegender Proben.**

Von den Dermatophyten ist *T. rubrum* als Erreger in 212 Fällen (64 %) der Nagelpilzkrankungen am häufigsten vertreten. Gefolgt wird er von den *Trichophyton species* (*T. species*), also nicht näher differenzierten Gattungen von Trichophyton, die 21 % der Fälle ausmachen. An dritter Stelle liegt *T. mentagrophytes* mit 9 %. Die übrigen Erreger aus der Gruppe der Dermatophyten wie *T. interdigitale*, *T. terrestre*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum* und *Epidermophyton floccosum* (*E. floccosum*) kommen selten vor.

### 5.5 Entnahmeort der Nagelprobe

Die Onychomykose tritt sowohl an den Finger- als auch an den Zehennägeln auf, wobei die Füße in der vorliegenden Untersuchung mit 82 % (520 Proben) deutlich häufiger betroffen waren als die Hände mit 10 % (61 Proben).



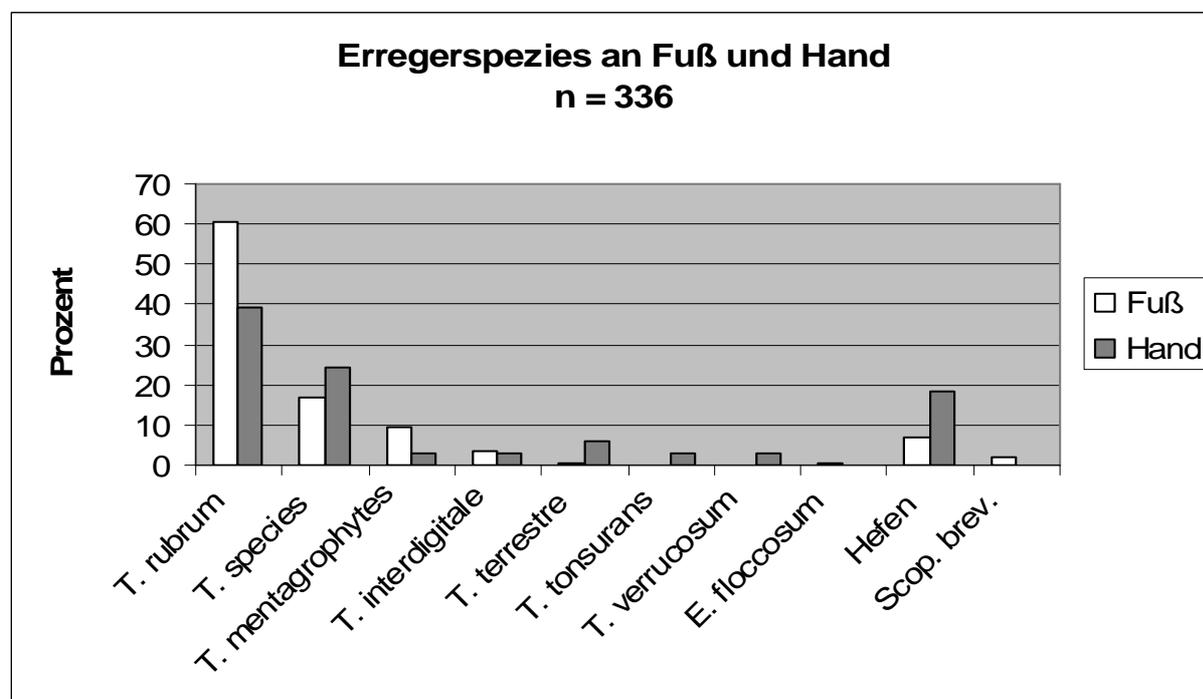
**Abbildung 11: Aufteilung der Onychomykose nach ihrer Lokalisation. n = 631 (Proben mit positivem Pilznachweis).**

Die Bezeichnung „keine Angabe“ bezieht sich auf diejenigen Proben (50 Fälle), bei denen nicht dokumentiert war, ob es sich bei dem Nagel um einen Finger- oder Zehennagel handelt.

Von den 520 an den Füßen entnommenen Proben konnte in 303 Fällen mittels Kultur ein Erreger identifiziert werden, bei den 61 Proben von Fingernägeln war dies in 33 Fällen möglich.

Bei genauerer Betrachtung lässt sich eine Tendenz feststellen, welche Erreger die Fingernägel und welche die Fußnägel häufiger befallen.

In 365 von den 631 Proben mit positivem Pilznachweis ist ein Erreger dokumentiert. Bei 29 Nagelproben fehlt allerdings die Differenzierung zwischen Hand und Fuß, so dass die Fallzahl (n) hier 336 beträgt.



**Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der nachgewiesenen Erreger auf Finger- und Fußnägel; n = 336 (Fuß = 303 + Hand = 33) keine Angabe zur Lokalisation in 29 Fällen.**

Anhand dieser Grafik zeigt sich, dass von den 303 Onychomykose - Fällen an den Füßen in 60% *T. rubrum* nachweisbar ist. *T. species* findet sich in 17 %, *T. mentagrophytes* in 9 % der Proben. Die selteneren Erreger kommen an den Füßen fast nicht vor (*T. terrestre* in einem Fall). *Scopulariopsis brevicaulis* als Schimmelpilz macht 2 % der an den Füßen nachgewiesenen Erreger aus, die Gruppe der Hefen 7 %.

An den Händen ist *T. rubrum* mit 40 % vertreten, gefolgt von *T. species* mit 24 % und den Hefen mit 18 %. Die restlichen Erregerzahlen liegen bei 3 %, nur *T. terrestre* mit 6 % etwas höher.

Die seltener vorkommenden Dermatophyten - *T. terrestre*, *T. tonsurans* und *verrucosum* - kommen also in unserer Untersuchung vor allem an den Händen vor, während der Schimmelpilz *Scopulariopsis brevicaulis* immer an den Zehennägeln zu finden ist. Für die Hefen ergibt sich eine Verteilung der 29 Fälle von 72 % an den Füßen zu 21 % an den Händen.

## 5.6 Dauer und Kosten der einzelnen Verfahren

Aufgrund der Tatsache, dass die Entscheidung für oder gegen eine Therapie von der Diagnosestellung abhängt, ist die Zeit, welche ein Verfahren bis zum endgültigen Ergebnis in Anspruch nimmt, von großer Bedeutung.

Nativbefund	Kultur	PAS
3 - 24 Stunden	27,5 Tage	1 – 3 Tage

**Tabelle 9: Dauer der einzelnen Testverfahren**

Während der Nativbefund in der Regel direkt nach Eintreffen der Probe im Labor fertig gestellt wird, dauert die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate durchschnittlich 2 Tage und die Kultur im Schnitt knapp vier Wochen.

Neben der Zeit bis zum Eintreffen des Ergebnisses sind für die Aufnahme eines Testverfahrens in die Routinediagnostik auch die Kosten von Bedeutung.

	Nativbefund	Kultur	PAS
Probenentnahme und Aufbereitung	2,33 €		7,75 € + Auslagen 5,47 €
Kulturelle Anzucht		6,99 €	
PAS – Färbung			20,40 €
Mikroskopie	6,99 €	6,99 €	12,65 €
<b>Gesamtuntersuchung</b>	<b>23,30 €</b>		<b>46,27 €</b>

**Tabelle 10: Kosten der einzelnen Testverfahren**

In der Tabelle sind die Kosten nach der Gebührenordnung für Ärzte (GOÄ) mit einfachem Satz angegeben. Für Nativbefund und Kultur gibt es eine gemeinsame Abrechnung für die Probenentnahme und Aufbereitung, da sie bisher als Goldstandard gelten und daher meist zusammen durchgeführt werden.

Die histologische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate ist fast doppelt so teuer wie Nativbefund und Kultur zusammen.

## 5.7 Auswertung des Vergleichs der Diagnoseverfahren

### 5.7.1 Gegenüberstellung der Einzelmethoden

Die Ergebnisse der einzelnen Diagnoseverfahren für eine untersuchte Probe wurden mit den Ziffern „1“ für positiv und „0“ für negativ kodiert. Anschließend konnte anhand des untenstehenden Schemas die Auswertung vorgenommen werden. Alle Proben, für die mindestens ein Diagnoseverfahren ein positives Ergebnis erbrachte, wurden als Träger einer Onychomykose definiert. Diejenigen, bei denen sowohl Nativ- als auch Kultur- und mikroskopische Untersuchung PASgefärbter Schnittpräparate negativ waren, wurden mit der Ziffer 0 kodiert und erscheinen in der untenstehenden Tabelle nicht mehr.

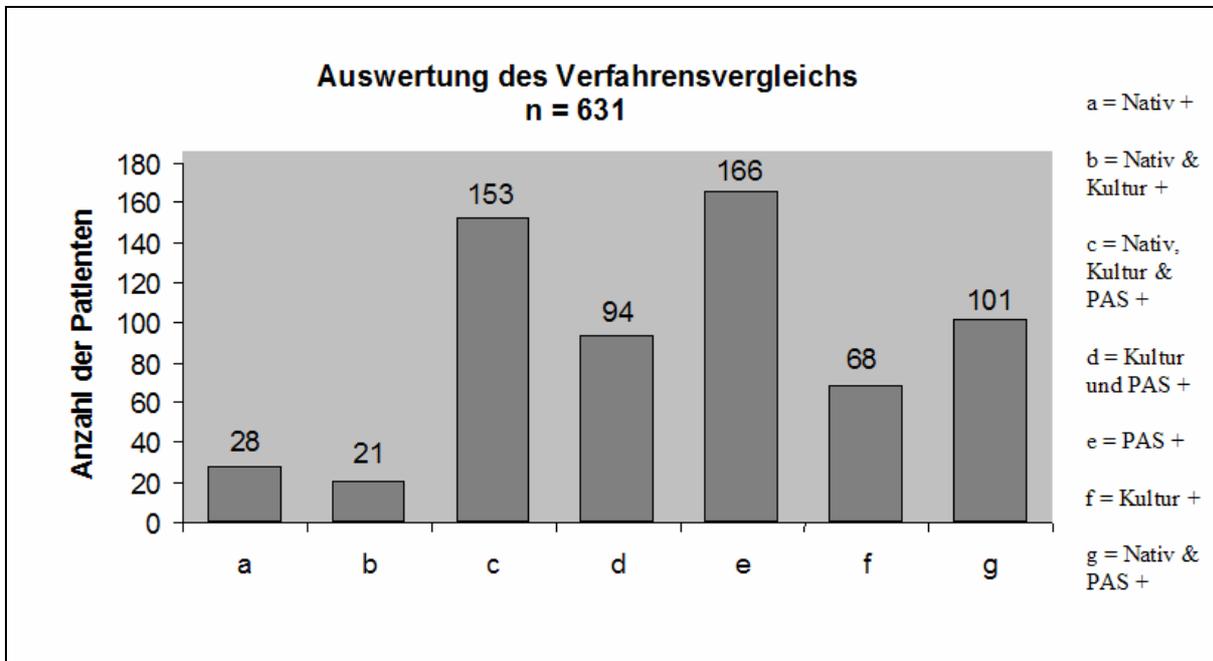
Auswertung	Nativ	Kultur	PAS	n =	%
<b>A</b>	1	0	0	28	4
<b>B</b>	1	1	0	21	3
<b>C</b>	1	1	1	153	24
<b>D</b>	0	1	1	94	15
<b>E</b>	0	0	1	166	26
<b>F</b>	0	1	0	68	11
<b>G</b>	1	0	1	101	16
<b>Summe</b>				631	100

Tabelle 11: Auswertungscode für den Vergleich der Diagnoseverfahren.

Der Buchstabe „a“ steht für den Fall, dass nur der Nativbefund zu einem positiven Ergebnis gekommen ist, im Fall „b“ wurde sowohl im Nativbefund als auch in der Kultur eine Pilzinfektion des Nagels nachgewiesen, „c“ bedeutet, dass alle drei Verfahren positiv waren u.s.w..

Jede untersuchte Probe erscheint in der Tabelle nur einmal, abhängig von der Kombination der Testergebnisse, die für sie zutrifft. Die Summe der Ergebnisse aller einzelnen Kombinationsmöglichkeiten ergibt die Gesamtzahl der Proben mit positivem Pilznachweis, wohingegen sich die Summe der positiven Ergebnisse für ein Diagnoseverfahren – unabhängig davon, ob ein anderes Verfahren auch positiv war – in der Abbildung 12 „Verfahrensspezifisch positive Ergebnisse“ ablesen lässt.

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der Auswertung aus obenstehender Tabelle bildlich verdeutlicht.

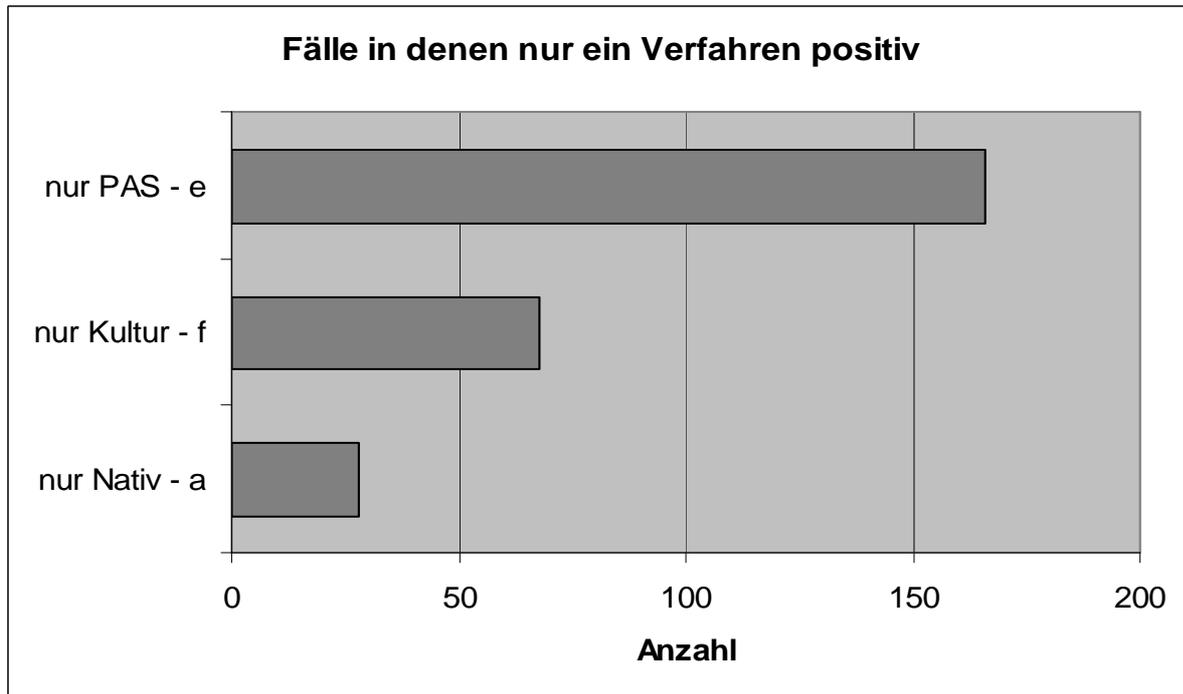


**Abbildung 13: Auswertung des Vergleichs der Diagnoseverfahren nach oben stehendem Schema.**

Die mit 26 % meisten Onychomykosefälle (166) wurden allein durch die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate erkannt (e), wobei alle drei Verfahren zusammen (c) mit 24 % nur geringfügig weniger Erkrankungen diagnostizieren konnten. Die Kultur allein (f) deckte 68 Fälle also rund 11 % auf, wohingegen der Nativbefund mit PAS (g) sowie die Kultur mit der PAS zusammen (d) je rund 15 % der Erkrankungen aufzeigten. Der Nativbefund allein (a) und der Nativbefund mit der Kultur (b) machten einen Anteil von insgesamt 8 % aus.

### 5.7.2 Fälle mit positivem Ergebnis in nur einem Testverfahren

In der folgenden Abbildung sind noch einmal die Fälle herausgegriffen, die nur von einem der drei Diagnoseverfahren erkannt wurden. D. h. also, dass nur der Nativbefund (a) oder nur die Kultur (f) oder nur die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate (e) positiv ausgefallen ist. Dadurch wird verdeutlicht, welche Nagelveränderungen bei Verzicht auf eines der Verfahren nicht als Onychomykose diagnostiziert würden.



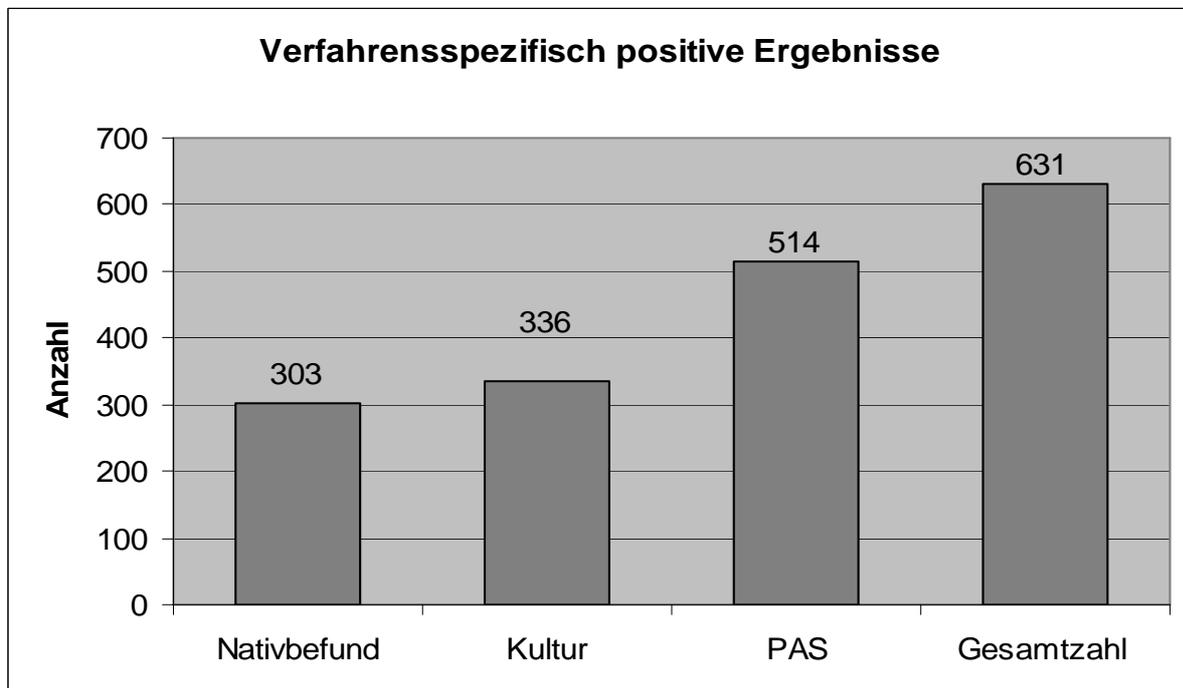
**Abbildung 14: Auftragung der Fälle, die nur von einem Diagnoseverfahren erkannt wurden.**

Die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate allein erkennt mit 166 Fällen ein Viertel der Nagelpilzkrankungen unabhängig von den anderen Verfahren. An zweiter Stelle folgt die Kultur mit 68 Fällen und an dritter der Nativbefund mit 28 positiven Pilznachweisen bei negativem Ergebnis der anderen beiden Verfahren.

### 5.7.3 Verfahrensspezifisch positive Ergebnisse

Wie oben schon erwähnt, sollten die positiven Ergebnisse nochmals nach den einzelnen Verfahren aufgeschlüsselt werden. Dies betrifft also die Fälle, in denen Nativbefund, Kultur oder mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate ohne Beachtung der Ergebnisse der jeweils anderen Untersuchungsmethoden einen positiven Pilznachweis erbrachten. Die Summe der verfahrensspezifisch positiven Ergebnisse hat nichts mit der Gesamtzahl der Proben mit positivem Pilznachweis zu tun, sondern ergibt lediglich die etwas abstrakte Größe der „Anzahl aller positiven Ergebnisse“ dieser Arbeit von 1153. Hier kommen also die Patienten mehrmals vor, deren Proben in mehr als einem Diagnoseverfahren positive Ergebnisse ergaben (b, c, d, g). In

der untenstehenden Grafik ist zum Vergleich die Gesamtzahl der Proben mit positivem Pilznachweis aufgetragen.



**Abbildung 15: Anzahl der Fälle mit positivem Pilznachweis je Verfahren.**

Von den 631 Onychomykosepatienten werden 514 durch die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate erkannt, bei der Kultur sind es 336, also gut die Hälfte der Fälle, und der Nativbefund liegt mit 303 unter 50 % der Fälle.

#### 5.7.4 Sensitivität

Bei der Sensitivität handelt es sich um die Fähigkeit eines diagnostischen Tests, Personen mit einer fraglichen Erkrankung als Kranke zu erkennen. Sie ist definiert als Quotient aus der Personenzahl mit positivem Testergebnis unter den Kranken und der Gesamtzahl der Kranken (Pschyrembel, 1998).

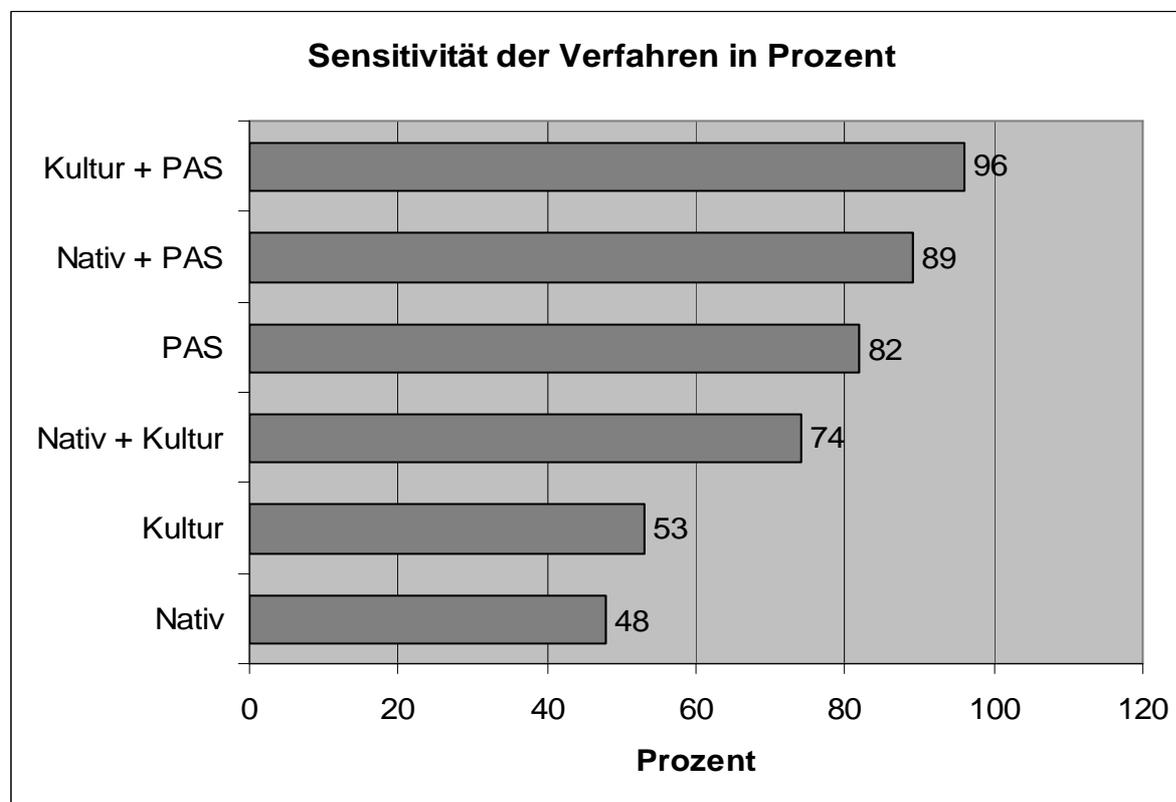
Wie im Artikel von Karimzadegan-Nia et al. (Karimzadegan-Nia et al., 2007) beschrieben, kann die Sensitivität der einzelnen Untersuchungsverfahren folgendermaßen berechnet werden: Per definitionem liegt dann eine Onychomykose vor, wenn eines der Diagnoseverfahren ein positives Ergebnis liefert – Dies ist also in unserer Untersuchung der Goldstandard.

Die Sensitivität ist demnach der Anteil der positiven Ergebnisse eines Testverfahrens an der Gesamtzahl aller Fälle mit der Diagnose einer Nagelpilzerkrankung nach den o.g. Kriterien.

Verfahren	Positive Ergebnisse	Sensitivität
Nativbefund	303	$303/631=0,48 \times 100 = 48 \%$
Kultur	336	$336/631=0,532 \times 100 = 53 \%$
PAS	514	$514/631=0,815 \times 100 = 82 \%$

**Tabelle 12: Beispielrechnung Sensitivität**

Die grafische Darstellung der Sensitivität folgt in der nächsten Abbildung.



**Abbildung 16: Sensitivität der einzelnen Verfahren berechnet nach der Definition von (Karimzadegan-Nia et al., 2007).**

Die höchste Sensitivität der einzelnen Testverfahren erreicht demnach die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate mit 82 % (514 positive Ergebnisse), während die Sensitivität von Kultur- und Nativbefund mit 53 % bzw. 48 % deutlich geringer ausfällt.

Betrachtet man die Kombinationen der Testverfahren, so erreicht die Kultur zusammen mit der mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate die höchste Sensitivität mit 96 %. An zweiter Stelle steht mit 89 % die mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate in der Kombination mit dem Nativbefund.

Unser Goldstandard beinhaltet alle Testverfahren, infolgedessen kann die Spezifität der einzelnen Verfahren nicht berechnet werden.

### 5.7.5 Negativer prädiktiver Testwert

Der negative prädiktive Testwert (NPV) besagt, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein testnegativer Patient tatsächlich gesund ist (Diez et al., 2006). Definiert ist er als Quotient aus denjenigen ohne bestätigte Diagnose und denjenigen mit negativem Test (Lawry et al., 2000).

1146 Patienten, 631 mit Pilznachweis, 515 ohne Pilznachweis.

Rechnung:  $NPV = \text{Nägel ohne Pilznachweis} / \text{diejenigen mit negativem Testergebnis}$ .

	Positives Ergebnis	Negatives Ergebnis	Quotient
Nativ	303	$1146 - 303 = 843$	$515 / 843 = 0,61$
Kultur	336	$1146 - 336 = 810$	$515 / 810 = 0,63$
PAS	514	$1146 - 514 = 632$	$515 / 632 = 0,81$

**Tabelle 13: Beispielrechnung Negativer prädiktiver Vorhersagewert**

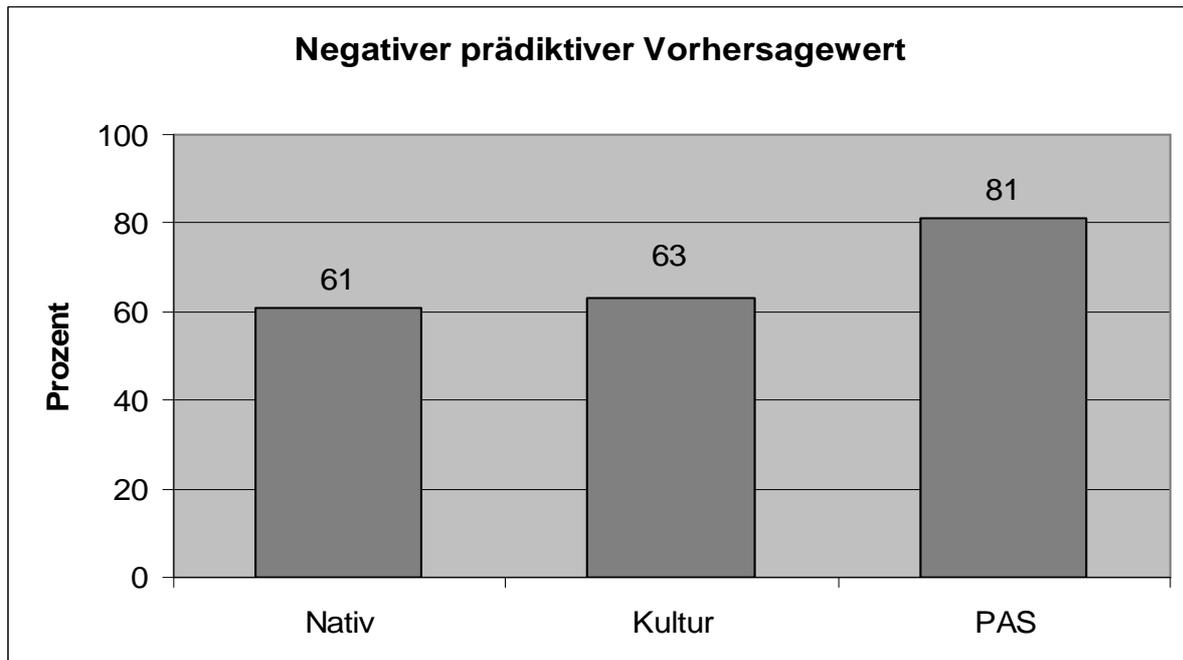
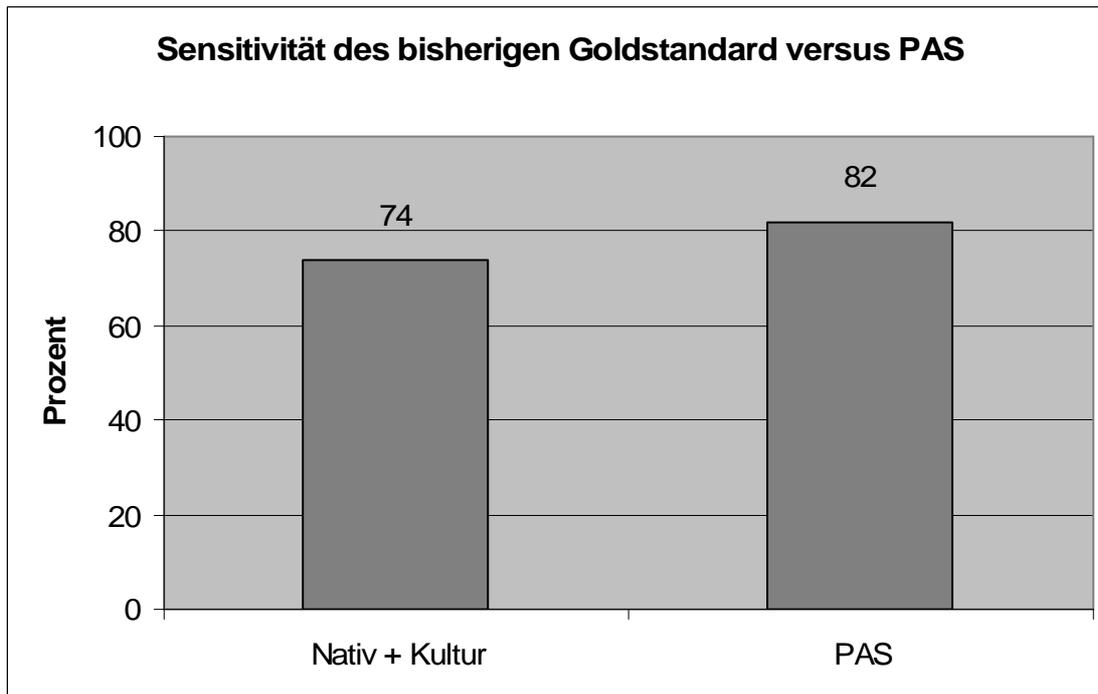


Abbildung 17: Negativer prädiktiver Vorhersagewert berechnet nach der Definition von (Lawry et al., 2000).

Mit der mikroskopischen Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate allein erreicht man einen NPV von 81%, bei der Kultur kann man in 63 % der Fälle bei einem negativen Testergebnis davon ausgehen, dass der Patient gesund ist. Der Nativbefund liegt mit 61 % knapp dahinter.

### 5.7.6 Mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate

Nach der gleichberechtigten Gegenüberstellung aller drei untersuchten Diagnoseverfahren geht es in diesem Abschnitt darum, die Besonderheit der PAS-Untersuchung noch einmal bildlich zu verdeutlichen.

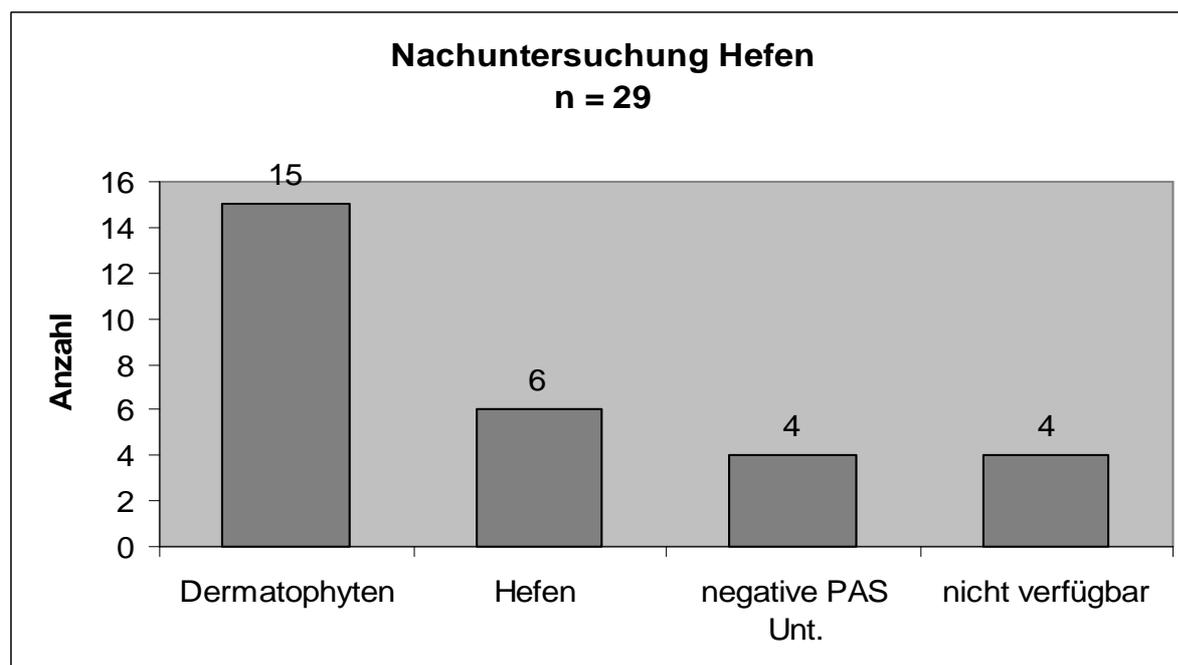


**Abbildung 18: Positiver Pilznachweis mittels mikroskopischer Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate gegenüber der Diagnose mittels Mikroskopie des Nativpräparates und der Kultur.**

Im Vergleich zum Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung des Nativbefundes sowie der Auswertung der kulturellen Anzucht des Erregers, die zusammen in 74 % der Fälle einen Pilznachweis erbringen, lassen sich durch die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate allein 82 % der Nagelspäne mit positivem Pilznachweis diagnostizieren.

### **5.8 Nachuntersuchung Hefen**

In den 29 Fällen, in denen in der Kultur Hefen nachgewiesen wurden und zusätzlich ein positiver Befund in der mikroskopischen Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate oder ein positiver Nativbefund vorlag, soll anhand einer Nachuntersuchung der histologischen Präparate festgestellt werden, ob die Hefen hier als mögliche Verursacher des Nagelpilzes in Frage kommen. Daher wurden die PAS-gefärbten Präparate dieser Patienten herausgesucht und nochmals lichtmikroskopisch daraufhin untersucht, ob hier Hefen in großer Zahl nachweisbar sind oder Dermatophyten zu dem positiven Befund geführt haben.

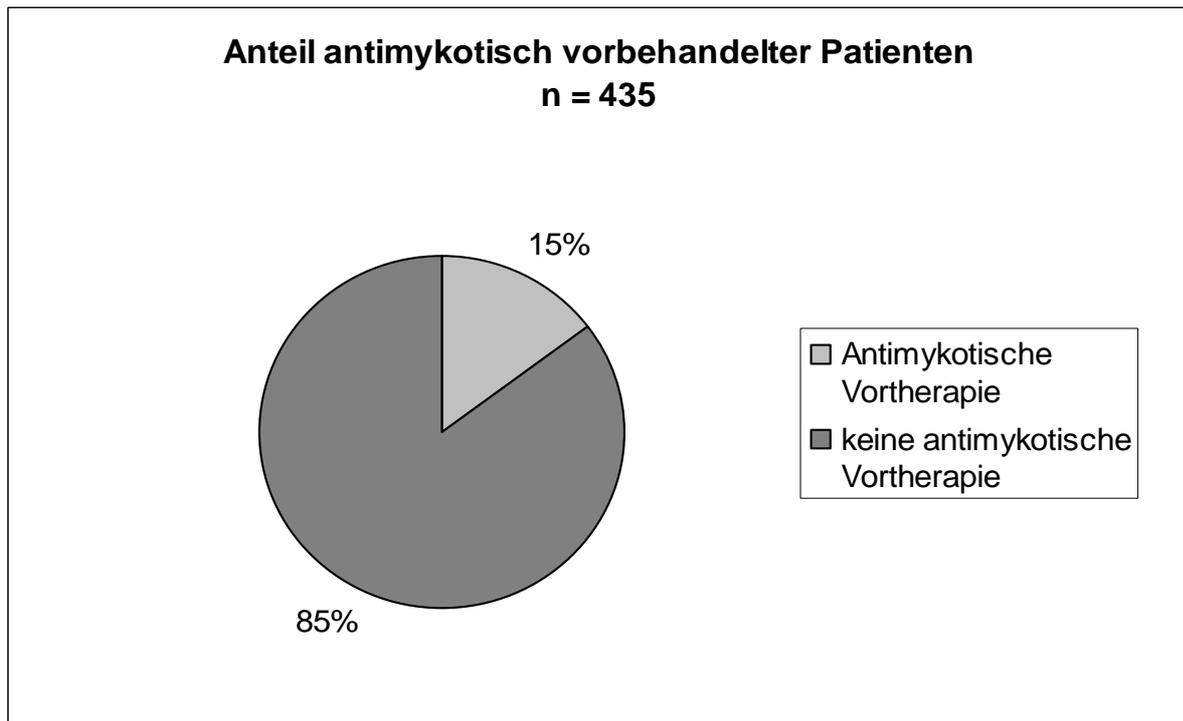


**Abbildung 19: Nachuntersuchung histologischer Befunde derjenigen Fälle in denen Hefen in der Kultur und ein positiver Pilznachweis in der mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate oder Nativbefund vorhanden waren.**

In 15 Präparaten zeigten sich Dermatophyten, in sechs Fällen wurden Hefen nachgewiesen, in je vier Fällen fiel die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate negativ aus. In weiteren vier Fällen waren die Präparate nicht verfügbar.

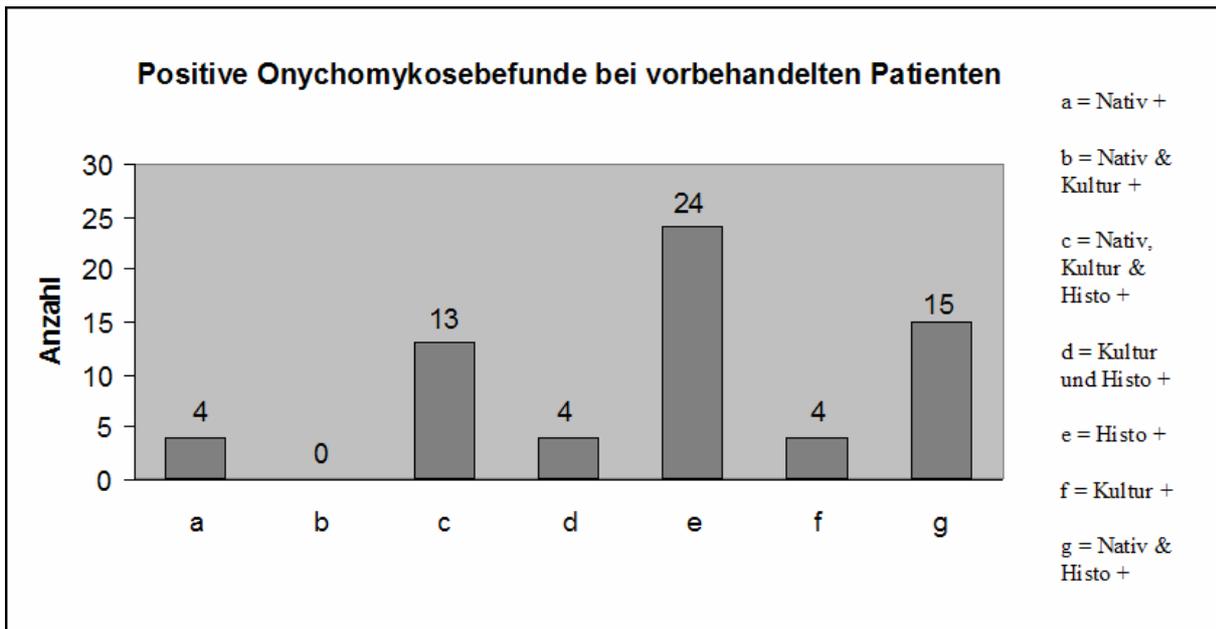
### **5.9 Antimykotische Vorbehandlung von Patienten**

Die Patientendaten wurden retrospektiv erhoben und auf eine antimykotische Vortherapie hin analysiert. Eine Vorbehandlung des Nagels erschwert die Diagnosestellung. Wir wollten in diesen Fällen herausstellen, welches Verfahren sich gerade in solchen häufig vorkommenden Situationen bewährt. Hierbei wurden uneindeutig bzw. überhaupt nicht dokumentierte Verläufe nicht berücksichtigt. Die Akten wurden in den Archiven der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie herausgesucht und auf eine schriftlich festgehaltene antimykotische Vorbehandlung der Finger- und Fußnägel hin untersucht. Verwendet werden konnten 435 der 631 Verläufe (69 %).



**Abbildung 20: Stichprobenartige Untersuchung der antimykotischen Vorbehandlung von 435 der 631 Patienten.**

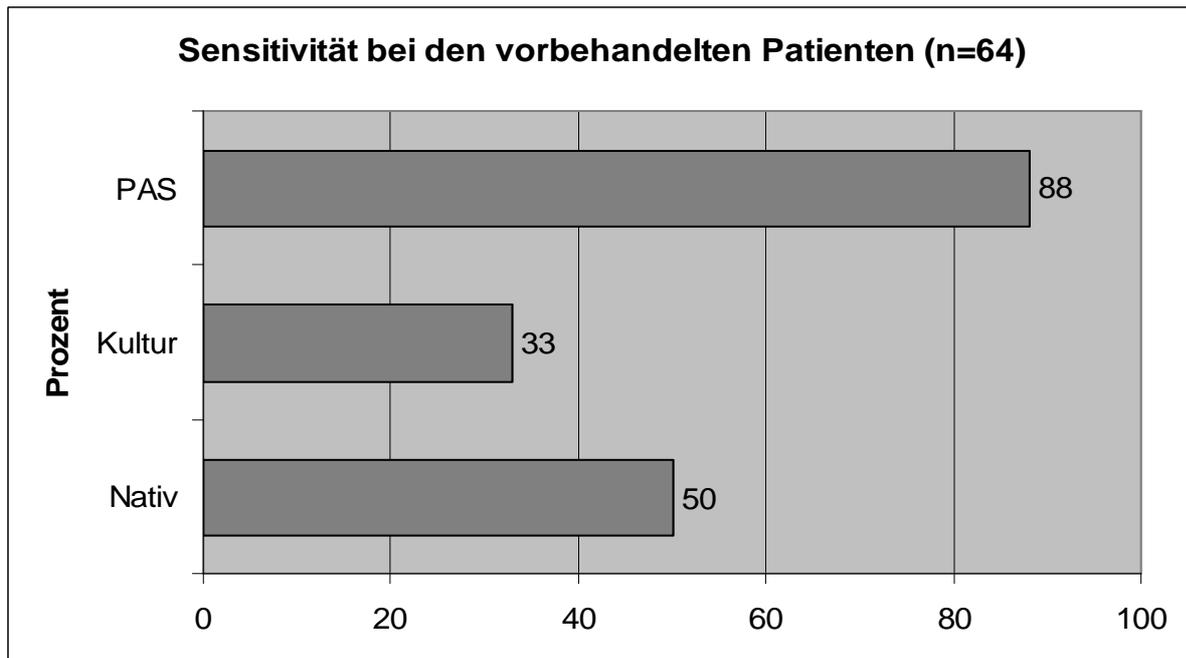
Von diesen 435 Patienten war bei 64 Patienten (15 %) eine antimykotische Vorbehandlung dokumentiert, bei den weiterhin untersuchten 371 Patienten (85 %) war keine antimykotische Vorbehandlung aus der Patientenakte zu erkennen.



**Abbildung 21: Anzahl der positiven Onychomykosebefunde bei antimykotisch vorbehandelten Patienten bezogen auf die verschiedenen Diagnoseverfahren.**

Zusammenfassend betrachtet stammten die meisten Proben, bei denen nur die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate positiv war (e), von antimykotisch vorbehandelten Patienten. Bezogen auf die Gesamtzahl der Proben mit positivem Pilznachweis bei vorbehandelten Patienten sind dies 38 %. In den Fällen, in denen die Kultur in Kombinationen mit der mikroskopischen Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate (d) oder nur die Kultur (f) positiv ist, war nur in je 6 % der Fälle eine antimykotische Vorbehandlung dokumentiert. Bei den Kombinationen, in denen alle drei Verfahren (c) oder Nativbefund und PAS (g) positiv sind, findet man je ca. 20 % der Proben mit positivem Pilznachweis bei vorbehandelten Patienten. Schließlich ging in keinem der Fälle mit gleichzeitig positivem Nativ- und Kulturbefund eine antimykotische Vorbehandlung voraus.

Betrachtet man die Sensitivität der drei Diagnoseverfahren nur bezüglich der 64 Patienten mit dokumentierter antimykotischer Vorbehandlung, so wird die Rolle der Mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate noch deutlicher.



**Abbildung 22: Sensitivität der drei Diagnoseverfahren bezogen auf die Gruppe der vorbehandelten Patienten.**

Die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate hat eine Sensitivität von 88 %, während die Pilzkultur mit 33 % und der Nativbefundes mit 50 % jeweils eine deutlich niedrigere Sensitivität aufwiesen. Auffällig ist zudem, dass in dieser speziellen Gruppe die Kultur sogar eine geringere Sensitivität besitzt als der Nativbefund. Dies entspricht also nicht genau den Verhältnissen bei Betrachtung des Gesamtkollektivs.

## **6 Diskussion**

### ***6.1 Patientenkollektiv***

In der vorgestellten Arbeit wurden Daten von insgesamt 631 Nagelproben mit positivem Pilznachweis retrospektiv analysiert. Das Patientenkollektiv wurde konsekutiv und nicht vorgefiltert im Zeitraum von 2000 bis 2006 aus den Datenbanken der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universität Bonn entnommen. Damit stellt sie einen weitestgehend repräsentativen Querschnitt durch die Bevölkerung dar. Bei den zwei verwendeten Datenbanken handelt es sich zum einen um die Mykologische Datenbank und zum anderen um die Datenbank der mikroskopischen Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate (Histologie).

Ziel dieser Untersuchung war es, die Sensitivität von Nativbefund, Kulturbefund und mikroskopischer Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate miteinander zu vergleichen. Nativbefund und Kulturbefund stellen den bisherigen Goldstandard in der Diagnostik der Onychomykose dar. Diese Untersuchung zeigt, dass die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate eine sinnvolle Ergänzung zu den beiden genannten Verfahren darstellt, wodurch die Sensitivität erhöht wird.

Im Vergleich zu den bisher zu diesem Thema vorliegenden Untersuchungen ist das Kollektiv der vorliegenden Arbeit mit 631 Proben um ein Vielfaches größer.

### ***6.2 Maximum der Onychomykoseerkrankungen zwischen 60. und 70. Lebensjahr***

In der vorliegenden Untersuchung ist die Mehrzahl der Patienten, von denen die Proben mit positivem Pilznachweis stammen, älter als 40 Jahre. Die größte Gruppe der Erkrankten ist mit 31 % der Fälle im Alter von 60 bis 70 Jahren zu finden. In der Altersgruppe jenseits des 70. Lebensjahres nimmt die Erkrankungshäufigkeit wieder ab, was sicherlich auch mit der demographisch geringeren Bevölkerungszahl im hohen Alter zusammen hängt. Die Zahl der unter 30 Jährigen ist mit 8 % erwartungsgemäß sehr niedrig.

Viele Studien haben gezeigt, dass die Inzidenz und Prävalenz der Onychomykose mit höherem Alter ansteigt (Elewski, 1998; Piérard, 2001). Auch eine prospektive Studie von Reisberger et al. hat ergeben, dass die Anzahl der vom Nagelpilz betroffenen Personen bis zum Alter von 60 Jah-

ren ansteigt. Der Altersgipfel der Patienten liegt dort zwischen 50 und 60 Jahren, während die Zahl der unter 30 Jährigen mit 6 % vergleichbar niedrig ist (Reisberger et al., 2003).

Für das „Achilles-Projekt“ wurden im Zeitraum vom Frühjahr 1997 bis 1998 rund 90000 Patienten (d. h. alle, die sich in diesem Zeitraum in den teilnehmenden Praxen vorstellten) in zwei Studienabschnitten auf das Vorhandensein einer Fußerkrankung untersucht. Auch diese groß angelegte Untersuchung kommt zu dem Schluss, dass die Prävalenz von Infektionen der Füße – sei es durch Pilze oder andere Ursachen – mit dem zunehmendem Alter ansteigt (Burzykowski et al., 2003).

An einer epidemiologischen Untersuchung zur Prävalenz der Onychomykose, der sogenannten „Foot-Check-Studie“, beteiligten sich im Zeitraum von September 1997 bis November 1998 600 niedergelassene Dermatologen in Deutschland. An einem bestimmten Tag wurden die ersten 20 Patienten (unabhängig vom Grund des Arztbesuches) auf Pilzinfektionen der Füße untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz der Nagelpilzerkrankungen – im Vergleich zu früheren Erhebungen – insgesamt gestiegen ist. Zudem wurde ein Anstieg der Prävalenz mit zunehmendem Lebensalter beobachtet (Abeck et al., 2000).

Sowohl in unserer Untersuchung als auch in der Literatur ist also eine Zunahme der Onychomykosefälle mit steigendem Lebensalter zu analysieren.

Verantwortlich dafür könnte u. a. das häufigere Vorkommen prädisponierender Faktoren sein. So findet sich mit zunehmendem Lebensalter auch eine Häufung bestimmter Erkrankungen (wie D. m., die periphere arterielle Verschlusskrankheit, periphere Neuropathien u. ä.) die mit trophischen Störungen u/o herabgesetzter Immunabwehr einhergehen. Hinzu kommt die Akkumulation von Traumata der Nägel im Laufe des Lebens, z. B. durch jahrelanges Tragen von anatomisch ungünstigem Schuhwerk. Dies führt häufig im hohen Alter zu orthopädischen Fußfehlstellungen, die wiederum Traumata der Nägel nach sich ziehen und damit den Pilzen eine Eintrittspforte eröffnen. Oft fällt es den älteren Menschen auch schwer, die Füße richtig zu pflegen, so dass sich beispielsweise ein Fußpilz unbemerkt chronifizieren kann und dann auch die Fußnägel langfristig infiziert werden können.

### **6.3 Höhere Prävalenz bei männlichen Patienten im Kollektiv**

Von den 631 Patienten mit positivem Pilznachweis waren in unserer Untersuchung zwei Drittel männlich und ein Drittel weiblich. Eine mögliche Ursache für diese Feststellung ist das bei Männern häufigere Tragen geschlossener, wenig atmungsaktiver Schuhe ganztags bei der Arbeit. Dadurch entsteht ein für die Pilze ideales Klima am Fuß, sie vermehren sich schneller und befallen dann auch leichter die Nägel.

Bei Frauen ist das Tragen von Schuhen mit hohem Absatz eine Quelle für Traumatisierungen der Nägel. Gegenüber dem weiblichen Geschlecht herrscht aber – vor allem im beruflichen Umfeld – eine viel breitere Akzeptanz, die Schuhe zwischenzeitig auszuziehen oder zu wechseln und so die Füße zu belüften. Dadurch wird der Fuß vor Wärme- und Feuchtigkeitsstau geschützt und man beugt dem Fußpilz als Wegbereiter für die Onychomykose vor.

In einer Untersuchung von Grover et al. (2003) waren von 120 Patienten mit Onychomykoseverdächtigen Nagelveränderungen 73 % Männer und 27 % Frauen. Effendy et al. (2005) ordnen das männliche Geschlecht zusammen mit dem höheren Alter und genetischen Faktoren sogar den prädisponierenden Faktoren für eine Nagelpilzerkrankung zu. In anderen Studien ist das Verhältnis zwischen Männern und Frauen allerdings auch ausgeglichen (Gianni et al., 2001; Karimzadegan-Nia et al., 2007). Die Ursache hierfür kann nur vermutet werden. Wahrscheinlich wurde eine bewusste Auswahl der Patienten getroffen, mit dem Ziel, ebenso viele männliche wie weibliche Probanden zu untersuchen.

Die übergreifenden Studien mit großen Fallzahlen, in denen es weniger um Aussagen zu Diagnoseverfahren oder Erregerverteilung geht, sondern mehr um die Erhebung genau solcher epidemiologischer Merkmale wie Alter und Geschlecht der Patienten, kommen aber zu dem Ergebnis, dass insgesamt mehr Männer als Frauen von der Onychomykose betroffen sind.

Ein Beispiel für eine solche Studie stellt die oben schon erwähnte „Foot-Check-Studie“ dar (Abeck et al., 2000). Auch die sehr groß angelegte „Achilles-Studie“ kommt zu dem Ergebnis, dass das Risiko, an Onychomykose zu erkranken, für Männer anderthalb Mal höher ist als für Frauen (Piérard, 2001).

Insgesamt bestätigt die vorliegende Untersuchung also die Meinung der Literatur, dass Männer häufiger von der Onychomykose betroffen sind als Frauen.

#### 6.4 Erreger der Onychomykose hauptsächlich Dermatophyten

Für die Speziesdiagnostik ist die kulturelle Anzucht des Erregers notwendig, da dies weder die Nativuntersuchung noch die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate leisten kann. Letztere können lediglich einen ersten Hinweis geben, ob es sich um Dermatophyten oder Hefen handelt. Zudem erfolgt mittels Kultur der Nachweis, ob die im Nagelmaterial gefundenen Erreger lebensfähig sind oder nicht.

In unserer Untersuchung konnte in 365 der 631 Fälle mit positivem Pilznachweis der Erreger mittels Kultur diagnostiziert werden.

Betrachtet man die drei großen Erregergruppen (Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze), so machen die Dermatophyten mit 90 % mit Abstand den größten Anteil aus. An zweiter Stelle folgen die Hefen mit 8 % und an dritter die Schimmelpilze mit 2 %. Die Dominanz der Dermatophyten wird von diversen Arbeitsgruppen bestätigt (Baran und Kaoukhov, 2005; Effendy et al., 2005; Elewski, 1997; Karimzadegan-Nia et al., 2007; Piérard, 2001), wobei wiederholt darauf hingewiesen wird – u.a. von Ellis et al. –, dass Schimmelpilze und Hefen oft als Kontaminanten infolge der körpereigenen Flora zu interpretieren sind (Ellis et al., 1997). Clayton (1992) fand bei der Untersuchung von 699 Patienten in Großbritannien ähnliche Verhältnisse wie in unserer Untersuchung mit 81 % für die Dermatophyten, 17 % für die Hefen und 2 % für die Schimmelpilze (Clayton, 1992).

Bei genauerer Betrachtung der Dermatophyten in der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass *T. rubrum* mit 64 % am häufigsten vertreten ist. Gefolgt wird er von den nicht genauer beschriebenen *T. species* mit 21 %, dem *T. mentagrophytes* mit 9 % und *T. interdigitale* mit 3 %. Die übrigen Dermatophyten wie *T. terrestre*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum* und *E. floccosum* sind mit je unter 1 % nur selten vertreten.

Elewski (1997) untersuchte 1069 Kulturen und kam bezüglich der 976 Kulturen mit Dermatophyten-Nachweis zu einem ähnlichen Ergebnis, wobei *T. rubrum* mit 97 % noch deutlicher vorne lag. Auch Ellis (1999) bestätigt, dass *T. rubrum* und an zweiter Stelle *T. mentagrophytes* die Haupterreger der Onychomykose darstellen. Die relativ kleine Untersuchung von 179 Fällen mit positivem Pilznachweis von Midley et al. (1994) kam zu dem Ergebnis, dass *T. rubrum* in 82 % der von Dermatophyten hervorgerufenen Fälle für die Erkrankung verantwortlich war, und unter-

stützt damit ebenfalls unsere These (Midgley et al., 1994). Auch Hay (2005) weist in seiner Beschreibung des europäischen und des asiatischen „Achilles-Projektes“ auf die große Bedeutung der Dermatophyten im Allgemeinen und des *T. rubrum* im Besonderen als Verursacher einer Nagelpilzerkrankung hin (Hay, 2005). Die prozentualen Anteile von *T. rubrum* und *mentagrophytes* sind oft etwas höher als in unserer Untersuchung, so auch bei Effendy et. al (2005).

Ursache dafür ist eventuell, dass bei uns ein Teil der *T. species* nicht genauer diagnostiziert werden konnte, und man nur spekulieren kann, wie sich diese 69 Fälle weiter aufteilen. Wir gehen davon aus, dass bei genauerer Betrachtung von diesen sicherlich noch einige weitere auf *T. rubrum* und *T. mentagrophytes* entfallen würden. Des Weiteren bleibt das Problem der Anwendung der neuen Nomenklatur für *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* bzw. var. *mentagrophytes*, welche bei uns in *T. mentagrophytes* und *T. interdigitale* differenziert wurden. Die unterschiedliche Verwendung dieser Begriffe macht den genauen Vergleich nicht möglich.

## 6.5 Nachuntersuchung Hefen

Aufgrund der zweiten mikroskopischen Untersuchung der histologischen Präparate derjenigen Fälle mit einem alleinigen Hefenachweis in der Kultur sowie positivem Pilzbefund in der Nativuntersuchung oder der Mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate verändert sich der Stellenwert der Hefen.

Histologisch fanden sich in diesen Präparaten mit 52 % am häufigsten Dermatophyten, so dass das Kultur-Ergebnis (Hefen) in diesen Fällen als falsch bzw. unzureichend gewertet werden muss. Man kann sagen, die Kultur war „falsch-negativ“ bezüglich der Dermatophyten. In vier Fällen derjenigen mit „Hefen“ in der Kultur war die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate negativ, der positive Befund stammte hier aus der Nativuntersuchung. Ebenfalls in vier Fällen war das Präparat nicht verfügbar. Die übrigen sechs Fälle wiesen auch in der Histologie große Mengen an Hefen auf, so dass diese hier tatsächlich Verursacher der Onychomykose sein könnten.

Eine solche Nachuntersuchung von Präparaten mittels Mikroskopischer Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate ist in der Literatur bisher so nicht beschrieben. Generell wird eine Speziesdifferenzierung in den vergleichbaren Studien einzig durch die Kultur vorgenommen. Ob eine Unterscheidung der unterschiedlichen Dermatophytenspezies mittels Mikroskopischer Untersu-

chung PAS-gefärbter Schnittpräparate möglich ist, wäre interessant zu untersuchen. Dermatophyten stellen sich als septierte Hyphen dar und sind daher oft recht gut zu erkennen. Hefen imponieren hingegen eher als rundliche Strukturen und sind nicht immer eindeutig von Sporen oder anderen Partikeln abzugrenzen; daher ist dieser Befund immer im Zusammenhang mit der Kultur zu interpretieren.

### **6.6 Mehrzahl der Onychomykosefälle betrifft die Fußnägel**

Grundsätzlich können humanpathogene Pilze sowohl die Finger- als auch die Fußnägel befallen. Allerdings kommt eine Onychomykose der Fingernägel bedeutend seltener vor, wie sich auch in unserer Untersuchung zeigt. Hier waren 82 % der suspekten Nagelbefunde an den Füßen aufgetreten und nur 10 % an den Händen, bei den übrigen 8 % lag keine Angabe über die Lokalisation der Probe vor.

Nolting et al. (2000) sprechen von einem Verhältnis der befallenen Finger- zu den Zehennägeln von 1:6 und die 168 Proben der Untersuchung von Midgley et al. (1994) verteilen sich zu 17 % auf die Finger- und 83 % auf die Fußnägel. In der deutlich kleiner angelegten Untersuchung von Karimzadegan-Nia et al. (2007) sind bei 36 % der 47 Patienten die Fingernägel betroffen, im Vergleich zu den sonstigen Angaben also eine recht große Gruppe. Das ist wahrscheinlich auf die Auswahl der Patienten durch einen Dermatologen zurückzuführen, wodurch nicht mehr ein ungefilterter Querschnitt der Patienten repräsentiert wird. Zudem ist durch die geringe Probandenzahl eine Verzerrung vorprogrammiert. Allgemein wird darauf hingewiesen, dass die Fußnägel 4 - 10 mal häufiger betroffen sind als die Fingernägel (Baran und Kaoukhov, 2005; Effendy et al., 2005; Tietz, 2001b).

Dieses Verteilungsmuster ist darauf zurückzuführen, dass die Füße durch das Tragen geschlossener Schuhe zum einen häufiger traumatisiert werden und zum anderen eine Abgabe der Feuchtigkeit und Wärme nach außen erschwert wird, wodurch ein für die Pilze ideales feuchtes und warmes Milieu entsteht. Zudem wachsen die Fußnägel langsamer als die Fingernägel, was den Pilzen das Eindringen in die Nagelplatte erleichtert. Wenn sich dann durch das okklusive Schuhwerk ein Fußpilz evtl. in Kombination mit einer Beschädigung des Nagels durch anatomisch falsch geformte Schuhe gebildet hat, so ist die Wahrscheinlichkeit einer Besiedlung der Nagelplatte sehr groß.

In der vorliegenden Arbeit haben wir zusätzlich die Verteilung der Erreger auf die Finger- und Fußnägel analysiert. Dabei wurde deutlich, dass *T. rubrum* in beiden Fällen die meisten Infektionen darstellt, gefolgt von *T. species* und *T. mentagrophytes*. Allerdings zeigte sich auch, dass die seltener vorkommenden Erreger wie *T. terrestre*, *T. tonsurans* und *T. verrucosum* an der Hand häufiger vertreten sind als am Fuß. Die beiden letztgenannten kommen in unserer Untersuchung sogar ausschließlich an den Fingernägeln vor. Im Gegensatz dazu wurde *Scopulariopsis brevicaulis* genau wie *E. floccosum* nur an den Zehennägeln nachgewiesen. Von den sechs Fällen, bei denen es sich gemäß der Nachuntersuchung wirklich um Hefen handelte, fanden sich vier an den Fußnägeln und einer an den Fingernägeln, einer war ohne Angabe.

Die meisten Studien differenzieren die Erreger nicht auf diese Art und Weise. Midgley et al. analysierten die Verteilung der Erreger in den 168 Proben mit Erregernachweis gemäß dem DHS-System und fanden heraus, dass die Hefen lediglich an den Fingernägeln nachzuweisen sind, während Schimmelpilze anscheinend die Fußnägel bevorzugen. Letztere Aussage stimmt mit den Ergebnissen für den *Scopulariopsis brevicaulis* in unserer Untersuchung überein. Was die Hefen angeht, so können wir diese Feststellung nicht bestätigen, allerdings würde eine größere Fallzahl mit positivem Hefenachweis benötigt, um eine genauere Aussage treffen zu können.

### **6.7 PAS kostenintensiver als bisheriger Goldstandard, aber zeitnahes Ergebnis**

Bisher gilt die Kombination aus Nativbefund und Kultur als Goldstandard in der Diagnostik der Onychomykose. Zusammen lässt sich so ein großer Anteil an Nagelpilzfällen richtig diagnostizieren. Beide sind relativ kostengünstig und zudem ist mittels Kultur eine genaue Speziesdiagnose möglich.

Die Untersuchung des **Nativpräparates** ist schnell durchführbar und liefert zeitnah ein Ergebnis. Allerdings ist sie stark untersucherabhängig und ggf. schwer interpretierbar.

Bis die **Kultur** ausgewertet werden kann, vergehen je nach Pilz jedoch im Durchschnitt 27,5 Tage. Dies ist ein relativ langer Zeitraum, wenn davon eine Therapieentscheidung abhängt.

Im Gegensatz dazu hat man bei der mikroskopischen Untersuchung **PAS-gefärbter Schnittpräparate** im Schnitt in 48 Stunden ein Ergebnis. Sie besitzt eine hohe Sensitivität und die Pilzstruk-

turen sind zudem durch die PAS-Färbung etwas leichter zu erkennen; eine genaue Speziesdiagnose des Erregers ist damit aber nicht möglich.

Die Arbeitszeit, die die Ärzte und die Labormitarbeiter mit der Aufbereitung einer Probe verbringen, ist allerdings auch noch zu bedenken. Für die Herstellung eines histologischen Präparates sind mehrere Schritte von der Entwässerung über die Einbettung bis zur Anfertigung und Färbung der Schnitte notwendig. Zwar sind davon einige Abläufe bereits apparativ durchführbar, aber dennoch ist die Arbeitskraft länger gebunden als für das Beimpfen einer Agarplatte oder die Herstellung eines Nativpräparates. Zudem ist die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate aufgrund der benötigten apparativen Gegebenheiten für den niedergelassenen Dermatologen nicht einfach durchführbar. Er müsste damit wahrscheinlich ein externes Labor beauftragen, während die Beurteilung des Nativpräparates und die Anlage und Auswertung einer Kultur weniger aufwändig sind.

Wahrscheinlich ist auch aus diesem Grund die mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate doppelt so teuer wie die Kombination aus Nativbefund und Kultur zusammen. Diese höheren Kosten lassen sich nur dann rechtfertigen, wenn dadurch die Diagnose einer Onychomykose eindeutiger und zuverlässiger getroffen werden kann als bisher. Immerhin sind wie oben bereits ausgeführt nur 50 % der Nagelveränderungen wirklich auf eine Pilzinfektion zurückzuführen, wodurch eine empirische Therapie mit systemischen Antimykotika absurd wäre. Aufgrund der zahlreichen möglichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen bis zum akuten Leberversagen und den Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten ist eine solche Therapie unter Umständen sehr risikobehaftet und nur bei sicherer Diagnose indiziert.

## **6.8 Vergleich der Diagnoseverfahren**

### **6.8.1 Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung in der Zusammenschau**

Weil eine langwierige systemische antimykotische Therapie sehr nebenwirkungsreich sein kann, ist eine korrekte Diagnose gerade bei der Onychomykose von großer Bedeutung (Daniel und E-lewski, 2000; Gianni et al., 2001; Weinberg et al., 2005). Zusätzlich sind auch die Kosten für die Therapie gerade über den langen Zeitraum zu berücksichtigen. Daher ist die Kernfrage unserer Untersuchung, ob neben dem bisherigen Goldstandard (Nativbefund und Kultur) die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate die Genauigkeit der Diagnose vergrößern kann. Die Anforderungen an ein Testverfahren bezüglich der Praxistauglichkeit sind allerdings groß. Es muss sowohl sensitiv als auch schnell durchführbar und dabei kostengünstig sein.

Bei der Auswertung der vorliegenden Untersuchung wurde deutlich, dass die mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate in 166 der 631 Fälle einen positiven Pilznachweis liefert, in denen Nativ- und Kulturbefund die Probe als negativ auf Pilze werteten. Das entspricht 26 % und liegt damit deutlich über den Zahlen, die die Nativuntersuchung (4 %) oder die Kultur (10 %) als positiv aufgedeckt haben, wenn die jeweiligen zwei anderen Verfahren ein negatives Ergebnis anzeigten.

Allerdings sind auch die Ergebnisse, welche die drei Verfahren in den verschiedenen Kombinationen erreichen, nicht zu vernachlässigen. Nativbefund, Kultur und Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate waren in 24 % der Fälle alle drei positiv, und die Kombinationen von PAS mit Kultur oder Nativbefund trugen jeweils nochmals 15 bzw. 16 % bei.

Betrachtet man die verfahrensspezifisch positiven Ergebnisse, so liegt die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate mit 514 der 631 Onychomykosefälle deutlich vor der Kultur mit 336 Fällen und dem Nativbefund mit 303 Fällen.

Allgemein ist zu beachten, dass die Untersuchung des Nativpräparates auch falsch-positiv oder falsch-negativ ausfallen kann. Im ersten Fall meist bedingt durch Verunreinigung und im zweiten Fall, weil – wie oben dargestellt – nicht unbedingt in jeder Teilprobe Pilze enthalten sind. Die Differenzierung zwischen Kontamination und pathogenen Keimen ist nur per Kultur möglich.

Allerdings kann es auch bei letzterem Diagnoseverfahren zu falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen kommen. Falsch-negativ fällt die Kultur beispielsweise dann aus, wenn der Patient bereits mit einem Antimykotikum anbehandelt worden ist und der Wirkstoff mit den Nagelspänen auf den Nährboden aufgebracht wird. Dabei inhibiert das Medikament das Pilzwachstum, so dass die Kultur negativ ausfällt, obwohl eine Infektion vorliegt. Oder die Pilze sind bereits beim Einbringen in das Kulturmedium nicht mehr vermehrungsfähig, wodurch das Wachstum in der Probe ausbleibt trotz Pilzbefalls.

Dies kommt zum Beispiel dann vor, wenn die Probe von distalen Nagelbereichen stammt, in denen die Pilzelemente oft schon abgestorben sind (Mehregan und Gee, 1999). Dies ist ein sehr häufiges Problem, da eine Vielzahl der Patienten bereits bei dermatologischer Erstvorstellung vor der Probenentnahme z. B. vom Hausarzt mit einem lokal aufzutragenden Antimykotikum anbehandelt worden ist. Dadurch ist die Diagnosesicherung erschwert, aber auch in diesen Fällen hat die mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate laut unserer Arbeit noch eine sehr gute Sensitivität (s.u.).

Ein falsch-positives Ergebnis kann beispielsweise aus der Kontamination des Kulturmediums mit Keimen der Umgebung oder aus der körpereigenen Flora resultieren (Weinberg et al., 2003).

	Nativ	Kultur	Kultur + Nativ	PAS	Nativ + PAS	Kultur + PAS
Sensitivität	48 %	53 %	74 %	82 %	89 %	96 %
NPV	61 %	63 %	76 %	81 %	88 %	95 %

**Tabelle 14: Übersicht zur Auswertung des Verfahrensvergleichs**

Besonders deutlich wird die Aussagekraft der einzelnen Testverfahren und ihrer Kombinationen anhand der Berechnung ihrer **Sensitivität** nach Karimzadegan-Nia et al. (2007). Die Kultur hat zusammen mit der mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate in unserer Untersuchung die höchste Sensitivität von 96 %, das heißt, dass bei der Untersuchung einer Nagelprobe mit diesen beiden Diagnoseverfahren lediglich 4 % der Fälle der Diagnose entgehen.

An zweiter Stelle steht die Kombination aus Nativbefund und mikroskopischer Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate mit einer Sensitivität von 89 %, gefolgt von der mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate allein mit 82 %. Kulturbefund und Nativbefund kommen zusammen noch auf eine Sensitivität von 74 %, während die Kultur und der Nativbe-

fund allein weit niedrigere Werte von 53 und 48 % erreichen. Vom derzeitigen Goldstandard werden also deutlich weniger Pilzinfektionen erkannt.

Des Weiteren haben wir nach Lawry et al. (2000) den **negativen prädiktiven Testwert** (NPV) berechnet, welcher besagt, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein testnegativer Patient tatsächlich gesund ist. Auch der NPV sagt also etwas über die Verlässlichkeit eines Testverfahrens aus.

Für die mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate beträgt die Wahrscheinlichkeit 81 %, dass durch dieses Verfahren ein Patient korrekt als gesund diagnostiziert wird. Die Werte für die Kultur und den Nativbefund liegen mit 63 und 61 % wesentlich niedriger, was eindeutig für die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate spricht.

### 6.8.2 Die vergleichbar aufgebauten Studien haben geringere Fallzahlen, aber ähnliche Ergebnisse

	Fallzahl n = (Onychomykose+)	Nativ %	Kultur %	PAS %
Vorliegende Untersuchung	1146 (631)	Sens. 48 NPV 61	Sens. 53 NPV 63	Sens. 82 NPV 81
(Lawry et al., 2000)	63 (47)	Keine Angabe	Sens. 32 NPV 33	Sens. 85 NPV 70
(Karimzadegan-Nia et al., 2007)	96	Keine Angabe	NPV 69	Sens. 81 NPV 85
(Gianni et al., 2001)	172 (112)	Sens. 91	Sens. 80	Sens. 83
(Reisberger et al., 2003)	387	Onych. + 156	Onych. + 100	Onych. + 182
(Weinberg et al., 2003)	105 (93)	Sens. 80 NPV 58	Sens. 59 NPV 43	Sens. 92 NPV 58
(Borkowski et al., 2001)	50 (36)	Sens. 44	Sens. 33	Sens. 77
(Machler et al., 1998)	23 (4)	Sens. 75	Sens. 100	Sens. 100
(Mehregan et al., 1997)	20		Sens. 80	Sens. 100

Tabelle 15: Übersicht über vergleichbare Studien bezüglich Fallzahl, Sensitivität und NPV

Eine Studie von **Lawry et al. (2000)** kam mit einem deutlich kleineren Patientenkollektiv zu ähnlichen Ergebnissen. Dort wurden die mit dem Nagelknipser gewonnenen Proben von 63 Patienten mit sechs verschiedenen Verfahren untersucht, unter anderem auch mittels Kultur auf Mykoselagar sowie Histologie mit PAS Färbung. Erstere erreichte lediglich eine Sensitivität von 32 %, während die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate mit 85 % eindeutig bessere Ergebnisse aufwies. Die Kombination mit der höchsten Sensitivität war auch hier die

Kultur zusammen mit der PAS und erreichte 94 %. Die Berechnung der Sensitivität erfolgte dabei wie in der vorliegenden Arbeit.

Was den NPV angeht, so lag auch hier die PAS offensichtlich vorn mit 70 %, die Kultur folgt mit 33 %. Insgesamt liegen die Werte also niedriger als in unserer Untersuchung. Die Differenz zwischen PAS und Kultur von 24 und 37 Prozentpunkten ist allerdings ähnlich. Damit ist die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate in beiden Untersuchungen der Kultur, was den NPV angeht, überlegen.

Auch **Karimzadegan-Nia et al. (2007)** haben die drei gängigen Diagnoseverfahren Nativbefund, Kultur und Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate bei der Untersuchung von 96 Patienten auf Nagelpilz miteinander verglichen. Von den 96 Patienten hatten 47 (49 %) einen positiven Pilznachweis und die Histologie war mit einer Sensitivität von 81 % als Einzelmethode den anderen überlegen. In der Kombination erreichte die PAS mit der Nativuntersuchung die höchste Genauigkeit mit 98 %, PAS und Kultur zusammen lagen mit 97% knapp dahinter. Die Ergebnisse der Untersuchung dieses bedeutend kleineren Kollektivs bestätigen unsere Beobachtungen bezüglich der Sensitivität.

Für die Auswertung wurde auch hier der NPV berechnet, wobei die Ergebnisse sich teilweise von unseren unterscheiden. Zwar ist auch bei Karimzadegan-Nia die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate mit 85 % die Einzelmethode mit dem höchsten NPV. An zweiter Stelle folgt jedoch nicht, wie bei uns, die Kultur, sondern die Nativuntersuchung mit 82 % – also dicht hinter der Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate.

Die Kultur ist in dieser Studie weit weniger zuverlässig bei der Identifizierung eines testnegativen Patienten als gesunde Person, ihr NPV liegt bei 69 %. Auch insgesamt liegen die Werte hier näher beieinander.

Man muss allerdings in Betracht ziehen, dass sich solche Verschiebungen auch schon aufgrund der geringeren Fallzahl und damit einer höheren Fehlerwahrscheinlichkeit ergeben. Trotzdem fällt auch hier auf, dass die geringe Verlässlichkeit des Nativbefundes in unserer Untersuchung eher ungewöhnlich ist. Die Gründe dafür liegen wahrscheinlich weniger am Verfahren selbst als eher an äußeren Faktoren.

Ein ähnliches Design wie unsere Arbeit hat auch die Studie von **Gianni et al. (2001)**. Sie untersuchten 172 Probanden mit Nagelveränderungen von denen 112 (65 %) in mindestens einem Diagnoseverfahren einen positiven Pilznachweis zeigten. In dieser Untersuchung lag die Sensitivität der einzelnen Verfahren dicht beieinander mit 91 % für den Nativbefund, 83 % für die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate und direkt dahinter mit 80 % die Kultur. Mitverantwortlich für den großen Anteil positiver Nativbefunde ist sicherlich auch, dass nicht nur der Nachweis von Hyphen als positiver Pilznachweis gewertet wurde, sondern zudem in fast der Hälfte der Fälle das Auffinden von Pseudohyphen den positiven Testergebnissen zugeordnet wurde. Letztere weisen auf eine Infektion mit Hefen hin, welche allerdings nur in seltenen Fällen wirklich ursächlich für eine Onychomykose sind. Häufiger handelt es sich bei den Hefen um eine Superinfektion oder eine Kontamination der Probe mit der körpereigenen Flora.

Etwas größer angelegt ist die Studie von **Reisberger et al. (2003)** mit 387 Nagelproben von 350 Patienten. Die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate war in 182 Fällen positiv, der Nativbefund in 156 und die Kultur in 100 Fällen. Für die Auswertung haben sich diese Zahlen allerdings nicht wie in den bereits zitierten Studien, auf die Gesamtzahl der Onychomykose-positiven, sondern auf die Gesamtzahl aller positiven Ergebnisse – in diesem Fall also 438 – bezogen. Auf die Bonner Untersuchung übertragen entfallen von insgesamt 1153 positiven Testergebnissen 26 % auf die Nativuntersuchung, 29 % auf die Kultur und 45 % für die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate alleine.

Reisberger et al. fanden eine ähnliche Tendenz für die PAS, die mit 42 % den größten Anteil an den positiven Ergebnissen erreichte. Der Nativbefund zeigte in ihrer Studie bessere Ergebnisse (36 %) als bei uns, während die Zahl für die Kultur mit 23 % denen unserer Untersuchung ähnelt.

Unsere Werte bezüglich Sensitivität Kultur und Histologie werden auch in der Untersuchung von **Suarez et al. (1991)** bestätigt. Die erste Gruppe mit 18 Probanden kann man nicht mit dem Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit vergleichen, da diese vor dem Eintritt in die Studie bereits positiv auf Nagelpilz getestet worden waren. Für die zweite Gruppe mit 74 Patienten hatte keine Vorauswahl stattgefunden, so dass sie trotz der geringeren Fallzahl mit unserer Untersuchung in Beziehung gesetzt werden kann. Hier erreichte die Histologie eine Sensitivität von 80 % und die Kultur 56 %. Dies entspricht etwa den von uns erhobenen Werten.

Mit **Weinberg et al. (2003)** stimmen unsere Werte nur insofern überein, als die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate die höchste Sensitivität der drei Verfahren hat, wenn man sie ohne ihre Kombinationsmöglichkeiten miteinander vergleicht. Sie haben 105 Proben mittels KOH, Kultur, Histologie und Fluoreszenzmikroskopie nach Calcofluor-white-Färbung untersucht, wobei sie letztere als Goldstandard definierten und die Ergebnisse der anderen Verfahren dazu in Beziehung setzten.

Die Sensitivität bezogen auf den Goldstandard betrug für den Nativbefund 80 %, für die Kultur 59 % und für die Histologie 92 %, also deutlich andere Werte als in der vorliegenden Untersuchung. Allerdings gab es neben den 76 Fällen, in denen mittels Calcofluor-white ein Pilznachweis gelang, weitere 17 Fälle, in denen mindestens eines der anderen drei Verfahren positiv war. Geht man von 93 Onychomykose-positiven aus und berechnet die Sensitivität in bezug auf diese Zahl, so liegen die Werte für die Histologie mit 83 % und für die Kultur mit 54 % sehr nah an denen unserer Untersuchung. Nur der Nativbefund bleibt mit 68 % sensitiver als bei uns, was entweder instrumentell oder untersucherbedingt sein kann.

Für den NPV gilt das gleiche wie für die Berechnung der Sensitivität – auch dieser wird in der Studie von Weinberg et al. anhand der vom Goldstandard Calcofluor-white ermittelten Onychomykose-positiven berechnet. Die Tendenz für die Werte ähnelt denen für die Sensitivität, denn die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate ist mit 77 % vorn, es folgen der Nativbefund mit 58 % und die Kultur mit 43 %. Im Gegensatz zu unserer Untersuchung ist also der Nativbefund zuverlässiger als die Kultur. Dass der Nativbefund in unserer Untersuchung so schlecht abgeschnitten hat, kann entweder durch den häufigen Wechsel der Untersucher bedingt oder durch eine schlechtere Qualität der Instrumente erklärbar sein. Die Aussage bezüglich der Vorreiterrolle der Mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate bestätigt sich aber auch anhand dieser Analyse.

Drei weitere kleinere Studien bestätigen die hohe Sensitivität der histologischen Untersuchung mittels PAS-Färbung und belegen, dass die Histologie der Kultur in einigen Fällen überlegen ist (Borkowski et al., 2001; Machler et al., 1998; Mehregan et al., 1997).

Aufgrund unserer Arbeit mit 631 Fällen mit positivem Pilznachweis und dem Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen kommen wir zu dem Schluss, dass die Mikrosko-

pische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate einen größeren Stellenwert in der Diagnostik der Onychomykose verdient.

### ***6.9 Bei Proben mit antimykotischer Vorbehandlung ist die histologische PAS-Färbung überlegen***

Ein von der AWMF empfohlener Einsatzbereich der Mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate ist die Untersuchung von Proben, bei denen eine Pilzdiagnostik mit dem bisherigen Goldstandard – Nativbefund und Kultur – voraussichtlich schwierig sein wird. Neben Faktoren wie der Kontamination mit körpereigenen Keimen oder Anflugskeimen ist eine antimykotische Vorbehandlung ein möglicher Grund für ein Fehlen lebensfähiger Pilze und damit für ein falsch-negatives Kulturergebnis.

Für die Untersuchung dieses Faktors wurden die Patientendaten retrospektiv erhoben und im Hinblick auf eine solche Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme analysiert.

Von den 631 Verläufen waren 435 (69 %) vollständig erfasst und damit für die Auswertung verwendbar. Bei 64 Patienten (15 %) war eine lokale oder systemische antimykotische Vorbehandlung des Nagelpilzes dokumentiert, so dass diese folglich genauer untersucht wurden. Interessant war für uns, inwieweit diese Proben aufgrund eines positiven histologischen Pilznachweises auffielen bzw., ob in diesen Fällen die Kultur negativ war.

Die Auswertung ergab, dass tatsächlich die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate mit 56 die meisten positiven Ergebnisse in dieser speziellen Gruppe erzielte und damit eine Sensitivität von 88 % erreicht. Betrachtet man dagegen die Werte für den Nativbefund und die Kultur, so stellt man fest, dass beide deutlich hinter der Histologie zurückbleiben und die Kultur mit 33 % in dieser Fallgruppe logischerweise eine geringere Sensitivität als der Nativbefund mit 50 % hat. Auch wenn man die einzelnen Kombinationsmöglichkeiten miteinander vergleicht, erreicht die Histologie mit 38 % den größten Anteil positiver Pilznachweise. An zweiter Stelle kommt die Kombination aus Nativbefund und Histologie, an dritter Stelle schließlich die Fälle, welche von allen drei Diagnoseverfahren erkannt werden.

Dieser Gesichtspunkt war in den anderen Studien nicht zu finden. Wir halten es aber für sehr wichtig, dies zu berücksichtigen, denn oft haben Patienten schon eigene Vortherapien durchgeführt. In diesen Fällen sehen wir einen klaren Vorteil der Mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate, denn in der Analyse der PAS-gefärbten Präparate sind Pilzelemente auch nach einer Behandlung noch zu erkennen. Die Kultur wird hingegen nach einer antimykotischen Therapie oft falsch-negativ (s. o.). Insbesondere auch dann, wenn man nach einer nicht erfolgreichen topischen Vorbehandlung eine neue effektive Therapie einleiten möchte, ist die Histologie hilfreich. Oder wenn während der Therapie einer Onychomykose eine Verlaufskontrolle durchgeführt werden soll, ist mit Hilfe der mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Pilzelemente eine Diagnose sicherer zu stellen.

Die Analyse von Proben antimykotisch vorbehandelter Patienten scheint sogar der Grund dafür zu sein, dass die Mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate nach unserer Untersuchung den ersten Rang in der Diagnostik einnimmt. Schließlich ist nicht auszuschließen, dass sehr viele Patienten bereits einen Therapieversuch unternommen haben, was jedoch anamnestisch nicht eruiert bzw. nicht dokumentiert wurde.

## 7 Fazit

Eine genaue Diagnosestellung mag bei der Onychomykose schwierig sein. Dennoch ist sie unabdingbar, um nicht-effektive, teure Therapien, Rückfälle und therapiebedingte Risiken sowie eine Ausbreitung der Pilzinfektionen zu verhindern (Piérard et al., 2006). Daher sollten alle notwendigen Maßnahmen ergriffen werden, um die Diagnose möglichst eindeutig zu stellen.

Nach Betrachtung der Ergebnisse unserer Untersuchung ist es sinnvoll, die mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate mit ihrer hohen Sensitivität in die Diagnostik der Onychomykose regelmäßig mit einzubeziehen. Wie wir nachweisen konnten, ist sie den anderen Testverfahren insbesondere in den Fällen überlegen, in denen bereits eine antimykotische Vorbehandlung stattgefunden hat. Dies ist jedoch nicht der einzige Punkt, da mittels mikroskopischer Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate insgesamt die meisten Onychomykosefälle bekannt werden; ob durch sie allein oder in der Kombination mit den anderen Verfahren. Zudem gelangt man mit der PAS sehr schnell zu einem Ergebnis, und die Pilzstrukturen sind im Gegensatz zum Nativbefund aufgrund der Färbung einfacher und sicherer zu erkennen.

Allerdings ist die Aufbereitung der Probe relativ zeitaufwändig und die Kosten sind etwa doppelt so hoch als für Nativbefund und Kultur.

Ein Nachteil der Mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate ist das Fehlen von Informationen über die Erregerspezies der Dermatophyten sowie über die Wachstumsfähigkeit der Erreger (Gupta und Ricci, 2006). Hier sind die Informationen aus dem Kulturbefund unersetzlich.

Auf die Kultur kann also nicht verzichtet werden. Zudem erreicht sie in der Kombination mit der Histologie insgesamt die höchste Sensitivität, so dass sie weiter in der Diagnostik der Onychomykose von großer Bedeutung ist. Von Nachteil ist die lange Dauer sowie die relativ niedrige diagnostische Verlässlichkeit der Kultur, die wie beim Nativbefund mit 50 - 70 % sehr niedrig sein kann, in Abhängigkeit von der Technik (Mehregan und Gee, 1999).

Zudem wachsen 30 % der einer Onychomykose zugrunde liegenden Dermatophytenstämme in der Kultur nicht an, so dass bei einer Diagnose, welche sich nur auf die Kultur stützt, das Ergebnis falsch-negativ wäre (Tietz, 2001a).

Ein großer Vorteil des Nativbefundes ist, dass direkt und ohne lange Wartezeit ein Ergebnis vorliegt. Allerdings lassen die Sensitivität und der NPV des Nativbefundes sehr zu wünschen übrig. Auch die starke Abhängigkeit des Ergebnisses von der Erfahrung des Untersuchers, welche zu falsch-negativen Aussagen führen kann (Panasiti et al., 2006), wirkt sich nachteilig aus. Zudem ähneln viele Strukturen in der direkten Mikroskopie den Pilzelementen, z. B. Fasern, Luftblasen, Fetttropfen, und können dadurch zu falsch-positiven Ergebnissen (Piérard et al., 2006) führen. Insgesamt können Nativ- und Kulturbefund in 30 - 50 % zu falsch-negativen Ergebnissen führen (Piérard et al., 2006).

Zusammenfassend kann man aus dieser Untersuchung folgern, dass eine Aufnahme der mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate in die Routinediagnostik der Onychomykose die Verlässlichkeit der Diagnose wesentlich erhöhen würde. Aufgrund der höheren Kosten und apparativen Aufwands wird es aber wohl nicht einfach sein, sie allgemein als Standard zu etablieren.

## 8 Zusammenfassung

Die Onychomykose ist eine chronische, langsam die Nagelplatte destruierende Pilzinfektion der Finger- oder Zehennägel, die an den Zehen oftmals bei chronischem Fußpilz entsteht.

In der Diagnostik der Onychomykose werden aktuell drei Verfahren konkurrierend bzw. gleichzeitig eingesetzt: 1. Nativdiagnostik, 2. Kulturbefund und 3. die mikroskopische Beurteilung PAS-gefärbter Schnittpräparate (PAS). Ziel der Arbeit war es, die Sensitivität des derzeitigen Goldstandards (Nativdiagnostik und Kulturbefund) mit der PAS zu vergleichen, um so die jeweilige diagnostische Aussagekraft zu evaluieren. Dazu wurden 1146 Nagelproben des Patientenkollektivs der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universität Bonn im Zeitraum der Jahre von 2000 bis 2006 retrospektiv erfasst und u. a. bezüglich Sensitivität, Negativem prädiktivem Testwert (NPV) und Erregerspezies analysiert. Die Untersuchung legt damit ein deutlich größeres Patientenkollektiv zu Grunde als frühere vergleichbare Untersuchungen.

631 Proben zeigten einen positiven Pilznachweis in mindestens einem der drei Verfahren. Dabei war die Sensitivität für die PAS in Kombination mit der Kultur am höchsten, gefolgt von der PAS kombiniert mit dem Nativbefund. Die Sensitivität der mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate als Einzelmethode folgte an dritter Stelle. Bei der Berechnung des NPV lag die PAS vorne, Kultur und Nativbefund erreichten je ca. 20 % weniger.

Die Korrelation mit den klinischen Daten zeigt, dass für die Diagnostik einer Onychomykose bei antimykotisch vorbehandelten Nägeln, die PAS-Untersuchung die höchste Sensitivität aufweist. Gerade diese Fälle kommen in der Praxis sehr häufig vor, wobei die Onychomykose hier mittels Nativbefund und Kultur leicht übersehen werden kann.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit folgt, dass die mikroskopische Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate als Einzelmethode eine höhere Diagnosesicherheit besitzt als der bisherige Goldstandard. Zur Einleitung einer effektiven Therapie und Reduktion unnötiger Behandlungen mit topischen oder systemischen Antimykotika sollte die Histologie daher in der Standarddiagnostik vermehrt eingesetzt werden. Insbesondere dann wenn bereits eine antimykotische Vortherapie stattgefunden hat oder eine Verlaufskontrolle Therapie gewünscht wird.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tinea corporis lichtmikroskopisch nach histologischer Aufbereitung und PAS-Färbung .....	13
Abbildung 2: Aufbau und Anatomie des Nagels und des Nagelbettes (Jung, 2003).....	15
Abbildung 3: Materialentnahme im Bild .....	34
Abbildung 4: Beispiele für die Speziesidentifizierung – T. rubrum auf verschiedenen Agarsorten, T. menta-grophytes, Epidermophyton floccosum auf Mykoseagar, Hefedifferenzierung auf Reisagar.....	38
Abbildung 5: Onychomykose lichtmikroskopisch – Nachweis PAS-positiver Pilzelemente, septierte Hyphen in 10-, 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung inklusive Ölimmersion.....	41
Abbildung 6: Anteil der Proben mit positivem und negativem Pilznachweis an der Gesamtzahl der Untersuchten. ....	42
Abbildung 7: Altersverteilung der Patienten mit Proben mit positivem Pilznachweis.....	43
Abbildung 8: Verhältnis der männlichen zu den weiblichen Patienten mit Pilznachweis.....	44
Abbildung 9: Erregernachweis in der Kultur der Proben gruppiert nach dem DHS-System. ....	45
Abbildung 10: Ausführliche Erregerauswertung der Kulturergebnisse vorliegender Proben. ....	46
Abbildung 11: Aufteilung der Onychomykose nach ihrer Lokalisation. n = 631 (Proben mit positivem Pilznachweis).....	47
Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der nachgewiesenen Erreger auf Finger- und Fußnägel; n = 336 (Fuß = 303 + Hand = 33) keine Angabe zur Lokalisation in 29 Fällen.....	48
Abbildung 13: Auswertung des Vergleichs der Diagnoseverfahren nach oben stehendem Schema. ....	51
Abbildung 14: Auftragung der Fälle, die nur von einem Diagnoseverfahren erkannt wurden. ....	52
Abbildung 15: Anzahl der Fälle mit positivem Pilznachweis je Verfahren. ....	53
Abbildung 16: Sensitivität der einzelnen Verfahren berechnet nach der Definition von (Karimzadegan-Nia et al., 2007).....	54
Abbildung 17: Negativer prädiktiver Vorhersagewert berechnet nach der Definition von (Lawry et al., 2000).....	56

Abbildung 18: Positiver Pilznachweis mittels mikroskopischer Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate gegenüber der Diagnose mittels Mikroskopie des Nativpräparates und der Kultur. ....	57
Abbildung 19: Nachuntersuchung histologischer Befunde derjenigen Fälle in denen Hefen in der Kultur und ein positiver Pilznachweis in der mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Schnittpräparate oder Nativbefund vorhanden waren. ....	58
Abbildung 20: Stichprobenartige Untersuchung der antimykotischen Vorbehandlung von 435 der 631 Patienten. ....	59
Abbildung 21: Anzahl der positiven Onychomykosebefunde bei antimykotisch vorbehandelten Patienten bezogen auf die verschiedenen Diagnoseverfahren. ....	60
Abbildung 22: Sensitivität der drei Diagnoseverfahren bezogen auf die Gruppe der vorbehandelten Patienten. ....	61

## 10 Literaturverzeichnis

- (1) Abeck D, Haneke E, Nolting S, Reinel D, Seebacher C. Onychomykose. Dtsch Arztebl 2000; 97: 1984-1986.
- (2) Baden HP, Soter NA. Cutaneous Mycoses. Dermatophytoses. In: Baden HP, Soter NA, Hrsg. Pathophysiologie of Dermatologic Diseases. USA: McGraw-Hill Book Company, 1984: 379-381.
- (3) Baran R, Kaoukhov A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. JEADV 2005; 19: 21-29.
- (4) Borkowski P, Williams M, Holewinski J, Bakotic B. Onychomycosis: an analysis of 50 cases and a comparison of diagnostic techniques. J Am Podiatr Med Assoc 2001; 91: 351-355.
- (5) Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M. Infektionskrankheiten. In: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M, Hrsg. Dermatologie und Venerologie. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005: 190-191.
- (6) Bristow IR, Baran R. Topical and oral combination therapy for toenail onychomycosis: an updated review. J Am Podiatr Med Assoc 2006; 96: 116-119.
- (7) Burzykowski T, Molenberghs G, Abeck D, Haneke E, Hay R, Katsambas A, Roseeuw D, van de Kerkhof P, van Aelst R, Marynissen G. High prevalence of foot diseases in Europe: results of the Achilles Project. Mycoses 2003; 46: 496-505.
- (8) Chandler, Kaplan, Ajello. Histopathological diagnosis. In: A colour Atlas and Textbook of the Histopathology of Mycotic Diseases. Wolfe Medical Publications Ltd, 1980: 18-22.
- (9) Clayton YM. Clinical and mycological diagnostic aspects of onychomycoses and dermatomycoses. Clin Exp Dermatol 1992; 17 (suppl): 37-40.
- (10) Daniel CR, Elewski BE. The Diagnosis of Nail Fungus Infection Revisited. Arch Dermatol 2000; 136: 1162-1164.
- (11) Diez C, Stoevesandt D, Mohr P. Ein Wort zur Statistik. In: Diez C, Hrsg. Die medizinische Doktorarbeit. Berlin: Lehmanns Media, 2006: 93-110.
- (12) Drake LA, Patrick DL, Fleckman P, André J, Baran R, Haneke E, Sapède C, Tosti A. The impact of onychomycosis on quality of life: Development of an international onychomycosis-specific questionnaire to measure patient quality of life. J Am Acad Dermatol 1999; 41: 189-196.

- (13) Effendy I, Lecha M, Feuilhade de Chauvin M, Di Chiacchio N, Baran R. Epidemiology and clinical classification of onychomycosis. *JEADV* 2005; 19: 8-12.
- (14) Elewski BE. Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis and Management. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 415-429.
- (15) Elewski BE. Large-scale epidemiological study of the causal agents of Onychomycosis: Mycological findings from the Multicenter Onychomycosis study of Terbinafine. *Arch Dermatol* 1997; 133: 1317-1318.
- (16) Elewski BE. Onychomycosis. Treatment, quality of life and economic issues. *Am J Clin Dermatol* 2000; 1: 19-26.
- (17) Ellis DH. Diagnosis of onychomycosis made simple. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: S3-S8.
- (18) Ellis DH, Watson AB, Marley JE, Williams TG. Non-dermatophytes in onychomycosis of the toenails. *Br J Dermatol* 1997; 136: 490-493.
- (19) Faergemann J, Correia O, Nowicki R, Ro B-I. Genetic predisposition - understanding underlying mechanisms of onychomycosis. *JEADV* 2005; 19 (Suppl.1): 17-19.
- (20) Gianni C, Morelli V, Amilcare C, Consuelo G, Rossini P, Guiducci A, Braidotti P, Calcaterra R, Papini M. Usefulness of histological examination for the diagnosis of onychomycosis. *Dermatology* 2001; 202: 283-288.
- (21) Grover C, Reddy BSN, Chaturvedi KU. Onychomycosis and the Diagnostic Significance of Nail Biopsy. *J Dermatol* 2003; 30: 116-122.
- (22) Gupta AK, Linh QT. Onychomycosis Therapies: Strategies to improve efficacy. *Dermatol Clin* 2006a; 24: 381-386.
- (23) Gupta AK, Linh QT. Therapies for Onychomycosis: A Review. *Dermatol Clin* 2006b; 24: 375-379.
- (24) Gupta AK, Ricci M-J. Diagnosing Onychomycosis. *Dermatol Clin* 2006; 24: 365-369.
- (25) Haneke E. Achilles foot-screening project: background, objectives and design. *JEADV* 1999; 12 (Suppl. 1): S2-S5.
- (26) Haneke E. Therapie der Nagelmykosen. *Hautarzt* 1993; 44: 335-345.
- (27) Hay R. Literature Review. *JEADV* 2005; 19: 1-7.
- (28) Hofmann H. Erregerbedingte Krankheiten - Mykosen der Haut. In: Jung EG, Noll I, Hrsg. *Dermatologie*. Stuttgart: Thieme Verlag, 2003: 99-113.
- (29) Jung EG. Nagelveränderungen. In: Jung EG, Noll I, Hrsg. *Dermatologie*. Stuttgart: Thieme Verlag, 2003: 455-458.

- (30) Karimzadegan-Nia M, Mir-Amin-Mohammadi A, Bouzari N, Firooz A. Comparison of direct smear, culture and histology for the diagnosis of onychomycosis. *Australasian Journal of Dermatology* 2007; 48: 18-21.
- (31) Karow T, Lang-Roth R. Antimykotika. In: Karow T, Lang-Roth R, Hrsg. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Köln: Thomas Karow, 2006: 766-774.
- (32) Kretschmar M, Hof H. Pilze. In: Hof H, Dörries R, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag GmbH, 2002: 450-488.
- (33) Lawry MA, Haneke E, Strobeck K, Martin S, Zimmer B, Romano PS. Methods for Diagnosing Onychomycosis - A Comparative Study and Review of the Literature. *Arch Dermatol* 2000; 136: 1112-1116.
- (34) Lecha M, Effendy I, Feuilhade de Chauvin M, Di Chiacchio N, Baran R. Treatment options - development of consensus guidelines. *JEADV European Academy of Dermatology and Venerology* 2005; 19: 25-33.
- (35) Machler BC, Kirsner RS, Elgart GW. Routine histologic examination for the diagnosis of onychomycosis: an evaluation of sensitivity and specificity. *Cutis* 1998; 61: 217-219.
- (36) Mehregan DR, Gee SL. The cost effectiveness of testing for onychomycosis versus empiric treatment of onychodystrophies with oral antifungal agents. *Cutis* 1999; 64: 407-410.
- (37) Mehregan DA, Mehregan DR, Rinker A. Onychomycosis. *Cutis* 1997; 59: 247-248.
- (38) Midgley G, Moore MK, Cook JC, Phan QG. Mycology of nail disorders. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: S 68-S 74.
- (39) Niewerth M, Korting HC. Management of Onychomycoses. *Drugs* 1999; 58: 283-296.
- (40) Panasiti V, Borroni RG, Devirgiliis V, Rossi M, Fabbrizio L, Masciangelo R, Bottoni U, Calvieri S. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. *Mycoses* 2006; 49: 26-29.
- (41) Piérard GE. Onychomycosis and other superficial fungal infections of the foot in the elderly: a pan-European survey. *Dermatology* 2001; 202: 220-224.
- (42) Piérard GE, Arrese JE, De Doncker P, Piérard-Franchimont C. Present and potential diagnostic techniques in onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 273-277.
- (43) Piérard GE, Quatresooz P, Arrese JE. Spotlight on nail histomycology. *Dermatol Clin* 2006; 24: 371-374.
- (44) Pschyrembel W. *Pschyrembel*. Berlin: de Gruyter, 1998.
- (45) Qadripur SA. Methoden. In: *Pilze und Pilzkrankungen - Ein Leitfaden für die Praxis*. Stuttgart - New York: Thieme Verlag, 1996: 74-81.

- (46) Reisberger EM, Abels C, Landthaler M, Szeimies RM. Histopathological diagnosis of onychomycosis by periodic acid-Schiff-stained nail clippings. *British Journal of Dermatology* 2003; 148: 749-754.
- (47) Schmid-Wendter M-H. Terbinafin. Systemische und topische Therapie von Pilzinfektionen. ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 2006.
- (48) Seebacher C, Brasch J, 2006: Onychomykose. <http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/11/013-003.htm> (10.01.2007)
- (49) Suarez SM, Silvers DN, Scher RK, Pearlstein HH, Auerbach R. Histologic evaluation of nail clippings for diagnosing onychomycosis. *Arch Dermatol* 1991; 127: 1517-1519.
- (50) Tietz H-J. Diagnostik von Hautmykosen. In: Tietz H-J, Mendling W, Hrsg. Haut- und Vaginalmykosen. Berlin - Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 2001a: 12-22.
- (51) Tietz H-J. Tinea unguium (Onychomykose). In: Tietz H-J, Mendling W, Hrsg. Haut- und Vaginalmykosen. Berlin - Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 2001b: 32-39.
- (52) Tietz H-J. Übersicht. In: Tietz H-J, Mendling W, Hrsg. Haut- und Vaginalmykosen. Berlin - Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 2001c: 3-12.
- (53) Tietz H-J, Sterry W. Substanzklassen und deren Wirkstoffe. In: Tietz H-J, Sterry W, Hrsg. Antimykotika von A - Z. Berlin - Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 2002a: 15-22.
- (54) Tietz H-J, Sterry W. Systemische Antimykotika. In: Tietz H-J, Sterry W, Hrsg. Antimykotika von A - Z. Berlin - Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 2002b: 25-58.
- (55) Tietz H-J, Sterry W. Tinea unguium (Onychomykose). In: Tietz H-J, Sterry W, Hrsg. Antimykotika von A - Z. Berlin - Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 2002c: 117-118.
- (56) Tietz H-J, Sterry W. Topische Antimykotika. In: Tietz H-J, Sterry W, Hrsg. Antimykotika von A - Z. Berlin - Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 2002d: 59-116.
- (57) Tosti A, Hay R, Arenas-Guzmán R. Patients at risk of onychomycosis - risk factor identification and active prevention. *JEADV* 2005; 19: S 13-S 16.
- (58) Weinberg JM, Koestenblatt EK, Jennings MB. Utility of Histopathologic Analysis in the Evaluation of Onychomycosis. *J Am Podiatr Med Assoc* 2005; 95: 258-263.
- (59) Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *Am Acad Dermatol* 2003; 49: 193-197.

## 11 Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Jörg Wenzel – Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Uniklinik Bonn – danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses Thema zu bearbeiten. Er hat mir immer wieder durch seine geduldigen Erklärungen und seine konstruktive Kritik den Schubs in die richtige Richtung gegeben.

Ebenso wichtig für das Gelingen dieser Arbeit war Frau Dr. Dagmar Wilsmann-Theis – Oberärztin der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Uniklinik Bonn –, die mir bei den inhaltlichen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch was den Aufbau der schriftlichen Ausführungen und die Durchsicht von Zwischenergebnissen angeht, konnte ich immer auf sie zählen.

Des Weiteren danke ich den MitarbeiterInnen der Privatambulanz, die mich bei der Suche nach den diversen Patientenakten aber auch bei anderen Fragen tatkräftig unterstützt haben. Sie hatten immer ein nettes Wort für mich und haben sich in der gemeinsamen Mittagspause nach dem Stand der Dinge erkundigt. Das hat mich sehr motiviert.

Ohne meine Eltern wäre es mir nicht möglich gewesen diese Doktorarbeit so zügig und zufrieden fertig zu stellen. Sie haben mir nicht nur die finanziellen Mittel zur Verfügung gestellt, sondern mich auch die ganze Zeit von der Themenfindung bis zur Abgabe der Arbeit begleitet. Danke, dass ich mit Euch immer über jegliche Schwierigkeiten und Bedenken reden konnte!

Großer Dank gebührt auch meiner Schwester Amelie, die mich in unseren regelmäßigen Telefonaten und bei Besuchen auf andere Gedanken und gute Ideen gebracht hat. Sie hat alle Höhen und Tiefen mit dem „Nagelpilz“ miterlebt, aber vor allem war sie mir auch sonst eine große Stütze. Und sie sorgte für die entscheidende Motivation vor Ende der intensivsten Zeit: Unser lang geplanter gemeinsamer Urlaub als Silberstreif am Horizont.

Meine Großmutter Ilse Hancken ist mit ihren 86 Jahren eine wichtige Persönlichkeit in meinem Leben. Sie hat mich bei der Dissertation nicht nur moralisch sehr unterstützt. Dank ihres Zupruchs wurde mir immer wieder bewusst, dass es wichtig ist, diesen Titel anzustreben und sich einmal wirklich umfassend in ein Thema einzuarbeiten.

Mein Freund Alexander macht sicherlich mehr als drei Kreuze, wenn das Wort Doktorarbeit endlich nicht mehr in Verbindung mit einem Seufzer auftritt ☺! Er hat vor allem in der letzten Phase meine Ungeduld ausgeglichen, meine Sorgen geteilt und mich immer wieder daran erinnert, dass die Arbeit auch mal fertig werden wird, wenn ich mich jetzt anstrenge. Außerdem hat er mir die Kraft gegeben[,] neben der Stelle als Assistenzärztin doch immer wieder häppchenweise weiterzumachen. Danke für die vielen schönen gemeinsamen Momente und die vollkommene Unterstützung!

Es würde zu weit führen, alle Freunde namentlich zu erwähnen, die für mich stets ein offenes Ohr, ein aufmunterndes Wort oder ein leckeres Essen bereithielten. Im Gespräch mit Euch sind mir oft noch neue wichtige Gesichtspunkte aufgefallen und auch bei allem anderen – sei es Umzug, Bewerbungen oder was sonst noch war – habt ihr mich sehr unterstützt. Vielen Dank!

Bei Anna K., Natalie R. und Katja S. möchte ich mich aber dennoch besonders bedanken. Sie waren mir besonders nah und haben jede auf ihre Weise zum Gelingen der Dissertation beigetragen. Wertvolle Tipps für die Herangehensweise an die Arbeit, Mut-mach-SMS, gemütliche Abende, gemeinsames Kochen, Reiten, Kino, Fahrrad putzen, über Gott und die Welt reden, Computerprobleme lösen, ausgehen, lachen oder einfach auch mal schweigen. Mal nicht an die Pflicht zu denken, ist eben auch sehr wichtig!

Essenziell war die Mitarbeit von Dirk R., welcher das komplette „Werk“ kurz vor der Abgabe Korrektur gelesen und durch sein brillantes Sprachgefühl gepaart mit medizinischem Sachverstand noch viele Ecken und Kanten geglättet hat. Dank Deiner Verbesserungsvorschläge und kleiner Zeichnungen am Rand hat sogar das 100ste lesen der Arbeit Spaß gemacht ☺ – Danke!

Last but by no means least gilt mein besonderer Dank der Familie Simon, Heike W. und Ingrid P.-A. Sie haben mir nicht nur ein Dach über dem Kopf gegeben, sondern mich auch in ihre Familien aufgenommen und mich mit aller Kraft unterstützt. Dank Euch hatte ich sowohl Ruhe zum Arbeiten, als auch die nötige Abwechslung – in Form von Reiten, nächtlichem Pferde fangen, „Meyers-Besuchen“, Turnieren, Grillen... – so dass mir immer wieder klar wurde: Es gibt eine Welt außerhalb des Computer!

## **12 Lebenslauf**

Frauke Ilse-Marie Sareika

Seit Okt. 2007

Assistenzärztin Abteilung Innere Medizin der  
Evangelischen Kliniken Bonn - Johanniterkrankenhaus