

nested PCR 法を用いた爪白癬の菌種同定と治癒判定の試み

佐藤 公美子¹⁾²⁾ 海老原 睦 仁¹⁾²⁾ 山崎 正 視¹⁾
 榎村 浩 一²⁾ 安部 茂 茂²⁾ 坪井 良 治¹⁾

¹⁾東京医科大学皮膚科学講座

²⁾帝京大学医真菌センター

【要旨】 東京医科大学病院皮膚科を受診した鏡検陽性の爪白癬患者 78 名の爪甲病変から直接真菌由来 DNA を抽出し、nested PCR 法により菌の検出並びに同定を行った。PCR には、28S rRNA 遺伝子の塩基配列から設計した真菌共通のプライマーと菌種特異的プライマーを使用した。その結果、30 サイクルの first PCR 陽性率は 62.8% (49/78 例)、nested PCR による皮膚糸状菌 DNA 陽性率は 85.9% (67/78 例)、*Trichophyton rubrum* は 82.1% (64/78 例)、*T. mentagrophytes* は 14.1% (11/78 例) であった。また、塩酸テルビナフィンとイトラコナゾール内服治療後の爪甲内の真菌由来 DNA の有無を 12 例で検討したところ、7 例で陰性化していた。またこの結果は白濁爪甲病変の有無とよく一致した。以上の結果より、PCR 法は爪白癬の爪甲病変から直接菌の同定が可能であり、内服治療後の早期治癒判定に有用であることが示唆された。

はじめに

爪白癬は、皮膚糸状菌の爪甲への感染により、爪甲の肥厚や混濁を呈する疾患である。高齢者に好発し、白癬の罹患率は 40 歳以上では 20% を超えるとされており、皮膚科の臨床現場において頻りに遭遇する重要な疾患のひとつである。

爪白癬の起因菌は *Trichophyton rubrum* が多く、*T. mentagrophytis* も時に認められる。また、皮膚糸状菌による爪白癬以外にも、比較的低頻度であるが、*Aspergillus* spp. などの皮膚糸状菌以外の糸状菌や、*Candida albicans* などの酵母真菌も、爪真菌症の起因菌として重要である。

従来爪白癬の診断と治癒判定は、直接鏡検と培養によって行われてきた。しかし、培養陽性率が 15-50% と低く、培養に数週間を要することなどが問題とされてきた²⁻⁵⁾。近年は病原性真菌を PCR 法などの分子生物

学的手法により分類、同定する方法が使用されている⁶⁾⁷⁾。

爪白癬の治療法としては塩酸テルビナフィンの 6ヶ月間連続内服療法と 3ヶ月間イトラコナゾール・パルス療法が一般的である⁸⁾。今回我々は、このような背景のもとに、直接鏡検により診断された 78 例の爪白癬患者から爪検体を採取し、菌種特異的プライマーを用いて nested PCR 法による菌種同定を行った。さらに、塩酸テルビナフィンやイトラコナゾールによる内服治療を実施した症例に対して、治療後の爪検体も解析し、皮膚糸状菌由来 DNA の有無を検討した。

対象および方法

〈対象患者〉

2006 年 1 月から 2007 年 8 月に東京医科大学病院皮膚科を受診した鏡検陽性の爪白癬患者 78 例 (男性 49 例、女性 29 例、10-85 歳、平均年齢 53.8±14.0 歳) を

平成 21 年 2 月 7 日受付、平成 21 年 2 月 26 日受理

キーワード：爪白癬、PCR、抗真菌薬

(別冊請求先：〒 160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学皮膚科学講座 佐藤公美子)

TEL：03-3342-6111 (5824) FAX：03-3342-2055

対象にした。原則的に第1趾の爪甲病変から、爪切りを用いて、それぞれの爪甲を数 mg 採取した。また、78 例中 12 例については、抗真菌薬内服開始 6 ヶ月後と 6 ヶ月以降 2 年以内に、1 回または複数回、爪検体を採取した。治療は塩酸テルビナフィン (ラミシール®) 125 mg/日の連続内服療法、またはイトラコナゾール (イトリゾール®) 400 mg/日を 7 日間内服 3 週間休薬のパルス療法 1 クールとして計 3 クール実施した。

〈特異的プライマーの作製〉

PCR に用いる特異的プライマーは、真菌の 28S rRNA 遺伝子の塩基配列から作製した (Fig. 1)。まず、真菌共通プライマー (fungal universal primers; FUP) を作製し、first PCR に使用した。さらに、皮膚糸状菌の *Trichophyton rubrum* と *T. mentagrophytes* に特異的なプライマー対を 28S rRNA 遺伝子配列に基づいて作製した (Table 1)。また、*T. rubrum* や *T. mentagrophytes* を含む全ての皮膚糸状菌を検出するために、皮膚糸状菌共通プライマー (dermatophyte universal primers; DPUP) を準備した (Table 1)。これら 3 種類のプライマー対は FUP 領域の内側に設計し (Fig. 1)、nested PCR に使用した。また、これらのオリ

ゴヌクレオチドは全て GenBank data base の 28S rRNA 遺伝子の配列に基づいて設計した (Table 1)。それぞれのプライマーの配列を GENETYX-MAC Version 10 (ソフトウェア開発、東京) により解析し、プライマーは Amersham-Pharmacia Biotech Co. Ltd (東京) より購入した。

〈真菌 DNA の抽出〉

作製したプライマーの特異性を検討するため真菌をサブロー培地 (Sabouraud dextrose agar; SDA; 1% ペプトン、1% グルコース、1.5% アガロース) にて 27°C で 5 日間培養した。少量のコロニー掻き取り、糸状菌溶解緩衝液 300 µl (200 mM Tris-HCl [pH 8.0]、25 mM EDTA、0.5% sodium dodecyl sulfate、250 mM NaCl) に入れ、グラインダー (Micro multi mixer®、Ieda Chemical、東京) を用いて 20~30 秒間粉碎した。サンプルを 10,000×g、10 分間遠心分離し、上清をフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1、v/v/v) で抽出した。DNA は最終的に 70% エタノールで洗浄し乾燥させたのち、50 µl の滅菌水を加えて溶解させ、糸状菌 DNA 液とした。また、爪白癬患者の爪検体を 3 g のメタルコーン (安井器械、大阪)

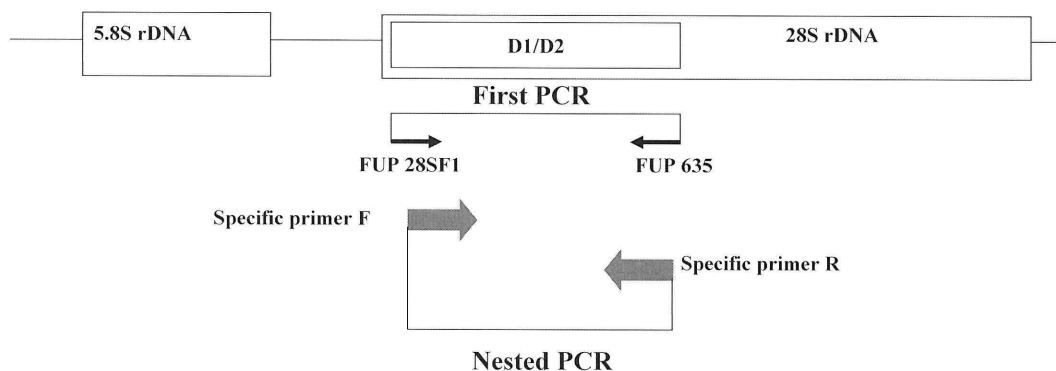


Fig. 1 Design of specific primers in the fungal 28S rRNA sequence.

Table 1 Primer pairs used in the present study

Target	Primer name	Sequence (5'→3')	PCR products size (bp)	GenBank accession No.
Fungus	FUP* 28SF1	AAGCATATCAATAAGCGGAGG] 600-650	
	FUP* 635	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		
Dermatophyte	DPUP** F1	AGTAGAGTGATCGAAAGGTT] 273-275	
	DPUP** R1	ATTACGCCAGCATCCGAG		
<i>T. rubrum</i>	TRUB F1	CGTCGCCCGTGCCTG] 137	AF378734, AY176744, AY213629
	TRUB R1	GAGCGCGTTTCTCAGTCT		
<i>T. mentagrophytes</i>	TMEN F1	GTGCTCGTCCCGTGT] 102	AF378739, AF378740, AF378738
	TMEN R1	GGCTATAAGACGTCCCG		

*fungus universal primers. **dermatophyte universal primers.

とともにマルチビーズショッカー (安井器械) にて 1800 r.p.m.、20 秒間粉碎した。その後、爪サンプルを溶解緩衝液に浸し、コロニーサンプルと同様の方法で DNA を抽出、50 μ l の滅菌水に溶解し、その半量 (25 μ l) を臨床検体の first PCR に用いた。

〈PCRによるDNAの増幅と検出〉

各サンプルの PCR 反応には、10×PCR 緩衝液 10 μ l、dNTPs 100 μ M (Amersham Biosciences Corp., NJ)、Taq polymerase 2.5 U、各プライマー 30 pmol、DNA 液 25 μ l を混合し、滅菌水を加え、総量 100 μ l の PCR 反応液とした。糸状菌コロニー由来の PCR 反応液を 94°C で 4 分間熱変性させた後に、94°C で 1 分間、60°C 15 秒間、72°C 15 秒間で 25 サイクル反応させ、72°C で 10 分間伸長反応を行った。PCR 産物を 1.2% アガロースゲルを用いて電気流動し、エチジウムブロマイド染色後に、紫外線照射下で増幅産物を検出した。爪検体の PCR 反応に関しては、FUP を用いて first PCR を施行した。94°C で 4 分間熱変性させた後に、94°C 1 分間、55°C 2 分間、72°C 1.5 分間で 30 サイクル反応させ、72°C で 10 分間伸長反応を行った。増幅陽性

産物は滅菌水で 100 倍希釈し、増幅陰性産物は原液のまま、それぞれ 1 μ l を nested PCR の検体として用いた。プライマーは *T. rubrum*、*T. mentagrophytes*、DPUP の 3 種類を用いた (Table 1)。94°C で 4 分間熱変性させた後に、94°C 1 分間、60°C 15 秒間、72°C 15 秒間で 25 サイクル反応させ、72°C で 10 分間伸長反応を行ったのち、同様に電気泳動にて増幅産物を検出した。また、それぞれの PCR 増幅産物は DNA シークエンシングキット (Applied Biosystems Japan Ltd.、東京) を用いて自動シークエンサー (Genetic Analyzer 310、Applied Biosystems) でシークエンスし、GENETYX-MAC 10 (ソフトウェア開発) で解析し、塩基配列の特異性を確認した。

結 果

〈白癬検出用プライマーの特異性の検討〉

培養真菌由来の DNA テンプレート (Table 2) を用いて、菌種特異的プライマーの特異性を検討した。PCR により、各真菌に対応するプライマーでは 100-600 塩基の増幅産物が検出された。(Fig. 2、Table 2)。

Table 2 Specificity of the dermatophyte primers

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
age	10	36	61	61	85	60	64	39	28	58	58	64	75	57	72	68	67	70	76	79	75	42	55	72	72	80	69	65	82	67	
sex	M	F	M	F	F	M	M	M	M	M	F	M	M	M	M	F	F	M	M	M	F	F	M	F	F	M	M	F	F	M	
FUP	○	-	-	-	○	○	○	-	○	○	-	-	○	○	○	○	○	-	○	○	-	○	-	-	○	○	○	○	○	○	
DPUP	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-
<i>T. rubrum</i>	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	○	-	○	○	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○
<i>T. mentagrophytes</i>	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	○	-	-

Sample No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60				
age	26	69	63	63	65	73	40	72	60	53	80	56	58	69	68	79	59	83	80	54	58	29	73	46	37	56	52	51	50	61				
sex	F	F	M	M	M	M	F	M	F	F	F	M	M	M	F	M	M	M	M	F	M	M	F	M	F	M	F	F	F	M				
FUP	-	-	○	○	-	○	○	-	-	-	-	-	○	-	○	○	○	○	○	-	-	-	-	○	-	-	-	○	○	○	○			
DPUP	○	-	○	○	-	○	-	○	○	○	○	-	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	-	○	○
<i>T. rubrum</i>	○	-	○	-	○	-	-	○	○	-	○	○	○	-	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	-	○	○
<i>T. mentagrophytes</i>	-	-	-	○	-	○	-	-	-	-	○	-	-	-	○	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sample No.	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
age	48	41	62	74	34	59	45	53	69	55	35	78	58	71	67	23	58	64	
sex	M	M	F	M	M	M	F	M	M	M	F	M	M	F	M	M	M	M	
FUP	-	-	○	○	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	○	○
DPUP	○	-	○	○	○	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>T. rubrum</i>	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>T. mentagrophytes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	○

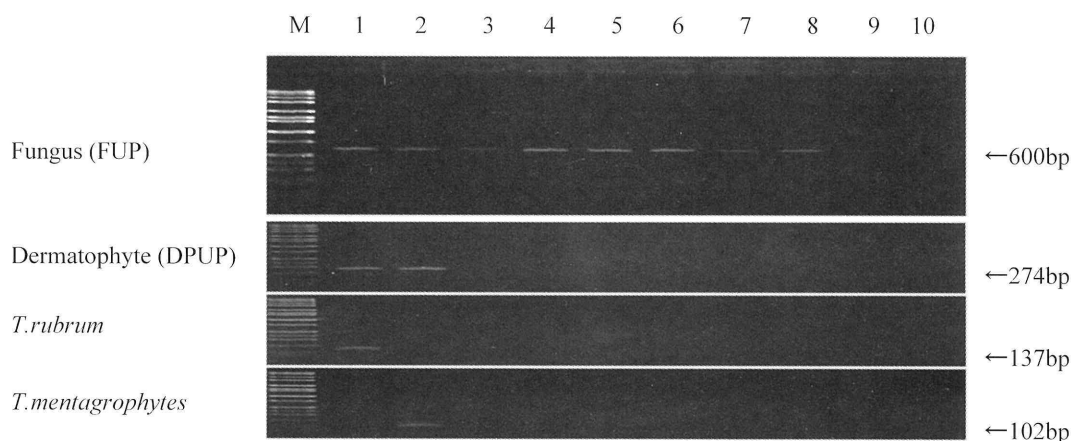


Fig. 2 Specificity of dermatophyte primers in gel electrophoresis.

M: DNA molecular marker (Roche, Mannheim, Germany); 1: *T. rubrum*; 2: *T. mentagrophytes*; 3: *Aspergillus flavus*; 4: *Scopulariopsis brevicaulis*; 5: *Fusarium solani*; 6: *F. oxysporum*; 7: *F. verticillioides*; 8: *C. albicans*; 9: *C. tropicalis*; 10: water (negative control). The arrows indicate the size of the PCR products.

T. rubrum、*T. mentagrophytes* のプライマーは菌種特異的であり、皮膚糸状菌以外の真菌 DNA に対しては反応しなかった。また、PCR 産物をシークエンスしたところ、報告されている遺伝子配列と 100% 一致した。

〈PCR による爪甲病変からの皮膚糸状菌遺伝子の検出〉

直接鏡検陽性の爪白癬患者 78 名から爪検体を採取し、前述のプライマーを使用して first PCR および nested PCR を実施した。Table 3 に示すように first PCR のバンド陽性率は 62.8% (49/78 例) であった。nested PCR のバンド陽性率は、皮膚糸状菌は 85.9% (67/78 例)、*T. rubrum* は 82.1% (64/78 例)、*T. mentagrophytes* は 14.1% (11/78 例) であった。また、*T. rubrum* と *T. mentagrophytes* の両菌種が検出された爪検体が 4 例あった。

〈抗真菌薬投与後の皮膚糸状菌遺伝子の検出〉

爪白癬患者 78 例のうち、抗真菌薬の投与後の爪検体の採取が可能であった症例は 12 例であった (Table

4)。内服投与前の first PCR のバンド陽性率は 50.0% (6/12 例) であったが、nested PCR のバンド陽性率は、皮膚糸状菌は 91.7% (11/12 例)、*T. rubrum* は 100% (12/12 例)、*T. mentagrophytes* は 0% (0/12 例)、塩酸テリビナフィン連続内服療法とイトラコナゾール・パルス療法の標準的な治癒判定時期である、治療開始 6ヶ月後に爪検体の採取が可能であった 7 例中 4 例では、first PCR と nested PCR が陰性であった。12 症例のうち PCR の実施時期は、投与開始 4ヶ月後から 16ヶ月後と幅があるが、12 例中 7 例で first PCR と nested PCR のいずれもが陰性となった。抗真菌薬の投与により爪甲内皮膚糸状菌 DNA が消失していたと考えられ、このことは白濁爪甲病変が消失ないし著明に減少したこととよく相関していた。

考 察

従来の培養法による爪白癬の原因菌同定は、爪甲検体からは培養陰性になることが多く、また培養から判

Table 3 PCR analysis for dermatophytes using toe nail samples from onychomycosis patients

Species examined	Strains	Primer sets for detection		
		<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	Dermatophyte (DPUP)
<i>Trichophyton rubrum</i>	CN011102601	+	-	+
	CN011102609	+	-	+
	KTR26	+	-	+
	KTR11	+	-	+
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	KTM1	-	+	+
	KTM14	-	+	+
	KTM18	-	+	+

Table 4 PCR analysis for dermatophytes using pre- and post-treated samples

Sample No.	Treatment	Treatment period	Detection by the primers			
			FUP	DPUP	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
4	T	pre	—	+	+	—
		9M	+	+	+	—
11	T	pre	—	+	+	—
		9M	—	—	—	—
20	I	pre	+	+	+	—
		16M	—	—	—	—
38	I	pre	—	+	+	—
		8.5M	+	+	—	+
41	T	pre	—	+	+	—
		4M	—	+	+	—
43	I	pre	+	—	+	—
		6M	—	—	—	—
44	I	pre	—	+	+	—
		6M	—	+	+	—
		10M	—	—	—	—
53	T	pre	+	+	+	—
		6M	—	+	+	+
57	I	pre	+	+	+	—
		6M	—	—	—	—
60	T	pre	+	+	+	—
		6M	—	—	—	—
64	T	pre	+	+	+	—
		6M	+	+	+	—
66	I	pre	—	+	+	—
		6M	—	—	—	—

M: month

I: itraconazole

T: terbinafine

定ままでに長期間を要することが問題点であった。しかし近年、PCR法を用いた分子生物的手法により、より迅速で正確な真菌の同定が可能になった。培養したコロニーからの同定では、arbitrarily primed PCR⁹⁾、制限酵素断片長多型¹⁰⁾、double-round PCR¹¹⁾、real-time PCR¹²⁾、PCR-direct sequencing¹³⁾¹⁴⁾などの手法が報告された。さらに、培養の過程で偽陰性となるリスクを低減するため⁴⁾¹⁵⁻¹⁷⁾、爪検体から直接真菌由来DNAを抽出する方法が報告された⁴⁾⁵⁾¹⁵⁻¹⁸⁾。これらの方法のポイントは、いかにして爪検体からのDNA抽出効率を高くするかということである。我々は種々の検討から、ビーズショッカーで物理的に真菌を破碎することが最もDNA抽出率を高くすることを見出した。また、爪甲中にヒト由来DNAが存在しないことも、真

菌DNA抽出率を上げるために有効であった。DNA増幅については、定性的ではあるものの感度と特異度の高いnested PCR法を使用した。またシークエンシングによりPCR産物の特異性を確認した。

今回我々の解析では、78例の爪白癬患者の爪検体に対し、FUPを用いたfirst PCRのバンド陽性率は62.8%であった。また、nested PCR法では85.9% (67/78例)が陽性であった。これはnested PCR法の検出感度の高さを支持する結果である。nested PCRは定性的であるが、2回のPCRを行ったことから、first PCR陽性検体は菌量が多いことも示唆された。今回の方法により検出された皮膚糸状菌は、*T. rubrum*が82.1%と圧倒的に多く、*T. mentagrophytes*は14.1%であった。菌検出率は従来の培養法に比較して圧倒的に高い

が、*T. rubrum*/*T. mentagrophytes* 検出比率に大きな変化はなかった。以上の結果から、爪検体から直接真菌由来 DNA を抽出し nested PCR 法で DNA を増幅する方法は、感度、特異性および再現性の点で有用な検査法であると考えられる。

我々は、この方法が爪白癬治療後の治癒判定に利用できるかどうかを検討する目的で、爪白癬患者 12 例の抗真菌薬内服後の爪検体から、真菌由来 DNA の検出および同定を試みた。7 例において、治療前に陽性であった真菌由来 DNA バンドが、治療後に陰性となった。真菌 DNA は菌死滅後も比較的安定と予想されたが、実際には治療開始 6ヶ月後に爪甲内 DNA が過半の症例で陰性化していた。したがって 28S rRNA 遺伝子の有無を経時的に確認することは、内服治療の有効性や治癒判定に有用であると考えられる。また、内服治療後にバンドが陰性となった 7 例のうち 3 例については、バンドが陰性となった時点で爪甲病変がわずかに残存していた。今後、さらに症例を集積する必要はあるが、nested PCR 法は爪真菌症の治癒について、臨床所見よりも早期に判定し得る可能性がある。Santos ら¹⁹⁾ は、*T. rubrum* 感染による爪真菌症患者のケトコナゾール内服治療後の爪検体を用いて PCR 解析を行い、内服治療前後で異なる菌株の *T. rubrum* が検出されたことを報告している。我々が経験した症例 44 における *T. rubrum* の再陽性化は過去の報告に矛盾しない結果と思われる。抗真菌薬の内服治療により起因菌であった菌株が消失し、異なる菌株による再感染を生じた可能性も否定できない。したがって、nested PCR 法は治療後の爪白癬の再発または再感染を検証する上でも有用であると考えられる。

今回の我々の検討に用いた抗真菌薬は塩酸テルビナフィン、イトラコナゾールともに 6 例ずつであったが、今後は、さらに多くの症例を集積し、内服治療後の爪検体真菌 DNA の経時的な発現変化について、薬剤の種類による有効性の違いも含め、検討していく予定である。

略 語

DNA : deoxyribonucleic acid
 RNA : ribonucleic acid
 rRNA : ribosomal RNA
 FUP : fungal universal primers
 DPUP : dermatophyte universal primers
 SDA : Sabouraud dextrose agar

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

TE : Tris-EDTA

dNTP : deoxyribonucleoside triphosphate

T. rubrum : *Trichophyton rubrum*

T. mentagrophytes : *Trichophyton mentagrophytes*

C. albicans : *Candida albicans*

文 献

- Bradley MC, Leidich S, Isham N, Elewski BE, Ghannoum MA: Antifungal susceptibilities and genetic relatedness of serial *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis of the toenail. *Mycoses* **42** Suppl 2: 105-110, 1999
- 坪井良治、Okeke CN、井上明美、山崎正視、比留間政太郎、小川秀興: 白癬菌アクチン (ACT) mRNA 定量的 PCR による爪甲中の白癬菌の同定と菌量の測定。 *Jpn J Med Mycol* **43**: 91-93, 2002
- Davies RR: Mycological tests and onychomycosis. *J Clin Pathol* **21**: 729-730, 1968
- Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, Devliotou-Panagiotidou D, Sotiriou E, Gräser Y: Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J Clin Microbiol* **44**: 1419-1427, 2006
- Monod M, Bontems O, Zaugg C, Léchenne B, Fratti M, Panizzon R: Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *J Med Microbiol* **55**: 1211-1216, 2006
- Jackson CJ: Molecular identification and strain typing of dermatophyte fungi. *Jpn J Med Mycol* **42**: 7-10, 2001
- 望月 隆、杉田泰之、楳村浩一、Kim JA、加納 墨、高橋一朗、Okeke CN、河崎昌子: 皮膚糸状菌への分子生物学の応用。 *Jpn J Med Mycol* **42**: 81-86, 2001
- 渡辺晋一、川島 眞、原田昭太郎: 爪白癬に対する経口抗真菌薬の治療効果および患者満足度 イトラコナゾールパルス療法とテルビナフィン連続療法との多施設共同群間比較試験。 *臨皮* **61**: 858-867, 2007
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J: Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Br J Dermatol* **137**: 351-355, 1997
- Kamiya A, Kikuchi A, Tomita Y, Kanbe T: PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *J Dermatol Sci* **34**: 35-48, 2004
- Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T: Fast, simple and highly sensitive double-round polymerase chain reaction assay to detect medically

- relevant fungi in dermatological specimens. Eur J Clin Invest **30**: 511-518, 2000
- 12) Gutzmer R, Mommert S, Küttler U, Werfel T, Kapp A: Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. J Med Microbiol **53**: 1207-1214, 2004
 - 13) Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H: Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol **40**: 358-364, 1994
 - 14) Ninet B, Jan I, Bontems O, L chenne B, Jousson O, Lew D, Schrenzel J, Panizzon RG, Monod M: Molecular identification of *Fusarium* species in onychomycoses. Dermatology **210**: 21-25, 2005
 - 15) Arabatzis M, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Kuijper EJ, de Hoog GS, Lavrijsen AP, Templeton K, van der Raaij-Helmer EM, Velegraki A, Gr aser Y, Summerbell RC: Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. Br J Dermatol **157**: 681-689, 2007
 - 16) Gupta AK, Zaman M, Singh J: Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* DNA from the nail samples of patients with onychomycosis by a double-round polymerase chain reaction-based assay. Br J Dermatol **157**: 698-703, 2007
 - 17) Savin C, Huck S, Rolland C, Benderdouche M, Faure O, Noacco G, Menotti J, Candolfi E, Pelloux H, Grillot R, Coupe S, Derouin F: Multicenter evaluation of a commercial PCR-enzyme-linked immunosorbent assay diagnostic kit (Onychodiag) for diagnosis of dermatophytic onychomycosis. J Clin Microbiol Apr **45**: 1205-1210, 2007
 - 18) Baek SC, Chae HJ, Houh D, Byun DG, Cho BK: Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and restriction enzyme analysis. Int J Dermatol **37**: 682-686, 1998
 - 19) de Assis Santos D, de Carvalho Araújo RA, Kohler LM, Machado-Pinto J, Hamdan JS, Cisalpino PS: Molecular typing and antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis pre- and post-treatment. Int J Antimicrob Agents **29**: 563-569, 2007

Detection of dermatophytes from onychomycosis patients using nested PCR

Kumiko SATO¹⁾²⁾, Mutsuhito EBIHARA¹⁾²⁾, Masashi YAMAZAKI¹⁾,
Koichi MAKIMURA²⁾, Shigeru ABE²⁾ and Ryoji Tsuboi¹⁾

¹⁾Department of Dermatology, Tokyo Medical University

²⁾Institute of Medical Mycology, Graduate School of Medical Science, Teikyo University

Abstract

We identified dermatophytes from nail samples using nested PCR. The fungal DNA was directly extracted from the affected nail plates taken from 78 onychomycotic patients who consulted our dermatology department at Tokyo Medical University Hospital. Fungal 28S ribosomal RNA gene was used to develop primer pairs for fungus universal primers (FUP), dermatophyte, *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes*. The positive detection rate of the first PCR assay with FUP at 30 cycles was 62.8% (49/78 cases). The nested PCR for dermatophyte was positive at 85.9 (67/78 cases), for *T. rubrum* at 82.1% (64/78 cases), and for *T. mentagrophytes* at 14.1% (11/78 cases). Furthermore, we compared the detection rate of fungal DNAs from 12 patients before and after antifungal treatment by terbinafine or itraconazole. After treatment, 7 out of 12 cases tested negative for fungal DNA, which correlated with the clinical manifestations. These data suggest that detection of fungal DNA by nested PCR directly from the nail samples is a sensitive and specific means of identifying dermatophytes, and is useful for formulating an appropriate method of treating onychomycosis following the administration of oral antifungal agents.

<Key words> Onychomycosis, PCR, Antifungal
