

14. Tagung der Arbeitsgruppe
„Mykologische Laboratoriumsdiagnostik“ innerhalb der
Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG)

Leipzig, 17. November 2000



Pietro Nenoff, Hautklinik des
Universitätsklinikums Leipzig AöR

Monika Krüger, Institut für Bakteriologie und
Mykologie der Universitätstierklinik Leipzig

Rhodotorula rubra auf Grünzagar

***Candida dubliniensis* – Klinische Relevanz und Wege zur Identifizierung**

Kathrin Tintelnot

Robert-Koch-Institut Berlin

Der Sprosspilz *Candida* (*C.*) *dubliniensis* wurde erstmals 1995 als eine neue Art innerhalb der Gattung *Candida* beschrieben (Sullivan et al. 1995). Wesentliches mikromorphologisches Charakteristikum sind reichlich vorkommende Chlamydosporen. So ist es nicht verwunderlich, dass nur wenige Mykologen und Mikrobiologen diese Hefe im Labor identifizieren, sondern die entsprechenden Isolate als der Spezies *C. albicans* zugehörig betrachten und herausgeben.

Nicht nur in Irland/Dublin sondern mittlerweile weltweit ist mit dem Vorkommen dieser *Candida*-Art zu rechnen. Nicht zwingend, jedoch überwiegend wird *C. dubliniensis* von AIDS-Patienten mit oropharyngealer oder ösophagealer Kandidose bzw. Besiedlung isoliert (Schorling et al. 2000). Daneben findet sich *C. dubliniensis* ebenfalls bei anderen Patienten mit Schleimhautkandidosen. Interessant ist, dass *C. dubliniensis* im Vergleich zu *C. albicans* *in vitro* empfindlicher gegenüber Antimykotika ist. Dem steht entgegen, dass vermutet wird, dass dieser neue Sprosspilz gerade wegen der verbreiteten und zunehmenden Antimykotikaphylaxe mit Azolen vermehrt gefunden wird.

C. dubliniensis ist neben *C. albicans* die einzige Hefe, die sowohl Keimschläuche im Serum, als auch Chlamydosporen auf Reis-Agar ausbildet. D. h., diese beiden phänotypischen Merkmale lassen eine Differenzierung der neuen Art nicht zu.

Einfaches Unterscheidungsmerkmal bleibt das temperaturabhängige Wachstum. So wächst *C. dubliniensis* nicht oder nur schwach bei 42 und erst recht nicht bei 45°C. *C. albicans*-Isolate wachsen dagegen bei diesen hohen Temperaturen sehr gut (Tintelnot et al. 2000).

Weiterhin hilfreich ist die biochemische Differenzierung mit der „bunten Reihe“. Hinweis auf *C. dubliniensis* ist die fehlende Assimilation folgender Substrate: D-Xylose, Methyl-D-Glukosid und DL-Laktat. Nur eine unsichere Unterscheidung ist auf dem Chrom-Agar möglich, auf dem *C. albicans* eher hellgrün, *C. dubliniensis* eher dunkelgrün erscheinen soll (Velegriaki & Logotheti 1998).

Hoffnungsvoll stimmt die gerade publizierte Untersuchung von Staib & Morschhäuser (1999). Sie verwenden den sog. Staib-Agar (Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar = Negersaat-Agar) zur Identifizierung der Art. Auf diesem Spezialnährboden bilden *C. dubliniensis*-Isolate im Gegensatz zu *C. albicans* mit 100%-iger Spezifität nach 48 Stunden Chlamydosporen (Staib & Morschhäuser 1999). Die *C. dubliniensis*-Kolonien sind aufgrund des myzelialen Wachstums außerdem rau und lassen sich auch so problemlos von den glatten *C. albicans*-Kolonien unterscheiden.

Letztlich sei erwähnt, dass aufgrund der genotypischen Unterschiede (ribosomale RNA kodierende DNA-Sequenzen, Karyotyp) u. a. mittels Polymerasekettenreaktion oder direkter DNA-Amplifizierung aus *C. dubliniensis*-Kolonien selbstverständlich auch eine eindeutige Speziesdifferenzierung möglich ist (Diaz-Guerra et al. 1999, Kurzai et al. 2000).

Literatur

Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca Estrella M, Laguna F, Rodriguez-Tudela JL (1999) Molecular characterization by PCR-fingerprinting of *Candida dubliniensis* strains isolated from two HIV-positive patients in Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis* 35, 113-119

Kurzai O, Frosch M, Mühlshlegel FA (2000) *Candida dubliniensis* – Mikrobiologische Identifizierung und Epidemiologie. *Hygiene und Mikrobiologie* 2/2000, 18-19

Schorling SR, Korting HC, Frosch M, Mühlshlegel FA (2000) The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-infected individuals. *Crit Rev Microbiol* 26, 59-68

Staib P, Morschhäuser J (1999) Chlamydospore formation on Staib agar as a species specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42, 521-524

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC (1995) *Candida dubliniensis* sp. Nov. Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141, 1507-1521

Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, Naumann D (2000) Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 38, 1599-1608

Velegraki A, Logotheti M (1998) Presumptive identification of an emerging yeast pathogen: *Candida dubliniensis* (sp. nov.) reduces 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. *FEMS Immunol Med Microbiol* 20, 239-241

Hefen in Futtermitteln

Evelin Ullrich; & Monika Krüger

Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Einleitung

Fakultativ pathogene Hefen sind die Ursache von Schleimhautinfektionen bei Menschen und Tieren und werden, besonders in der Zeit nach der Einführung von Antibiotika in die antimikrobielle Therapie, im Untersuchungsmaterial nachgewiesen (GEDEK 1968, 1980).

Disponierende Faktoren wie Stoffwechselerkrankungen, Immunsuppression und Antibiotikabehandlung unterstützen die exzessive Vermehrung fakultativ pathogener Hefen und führen zur Schädigung des Wirtes.

Wann diese fakultativ pathogenen Hefen plötzlich durch Veränderung der mikroökologischen Bedingungen im Tier in der Lage sind, Virulenzeigenschaften zu exprimieren, ist bisher kaum untersucht.

Candida (C.) albicans, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* (Synonym: *Torulopsis glabrata*) und andere Arten wurde als Erreger von nekrotisierenden Enterocolitiden, Osteomyelitiden und Endophthalmitiden beim Menschen beschrieben. Der Nachweis aus dem Urogenitaltrakt des Menschen gelingt häufig (BALEY et al. 1984, REDONDO - LOPETZ et al. 1990, RUBIN et al. 1990, CORBELLA et al. 1992).

Bei Tieren wurden Hefen bisher im Zusammenhang mit sporadischen Aborten, Mastitiden oder als Nebenbefund aus Exkrementen und aus dem Genitaltrakt erwähnt (van UDEN et al. 1958, BISPING 1961, 1964, MEHNERT et al. 1964, KIRKBRIDE et al. 1972). WADA et al. (1994) berichteten über eine *C. glabrata* - Infektion des Vormagens eines Kalbes. ELAD (1998) untersuchte Kotproben bzw. Magen - Darm - Inhalt von 500 Kälbern mit Diarrhoe bis zum Alter von 30 d, und stellte fest, daß bei 86%, der an Diarrhoe erkrankten Kälber, ab der 2. Lebenswoche *C. glabrata* im Kot nachzuweisen war. Zu ähnlichen Ergebnissen kam schon GEDEK (1969), sie wies, bei Kälbern die mit Milchaustauschern ernährt wurden, vermehrt *C. glabrata* im Kot nach. Diese Hefe hat in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin stetig an Bedeutung gewonnen. Futtermittel (Biertreber u. Silagen) sind häufig mit *C. glabrata* kontaminiert (GEDEK, 1968). Auch in unseren Untersuchungen von 1997 - 1998 war eindeutig nachzuweisen, daß Biertreber die Quelle der *C. glabrata* - Infektion in einem Kälberbestand (R.) mit hoher Morbidität (Diarrhoen) und Mortalität war. Sie belegen auch, daß *C. glabrata* über Kolostralmilch in den Magen - Darmtrakt der Kälber gelangte und hier vor allem im Alter von 8 - 14 Lebenstagen zu schweren klinischen Erkrankungen führte. Die massive Ausscheidung der Hefen führte zur Verbreitung der Erreger im gesamten Tierbestand, einschließlich der Umwelt und trug wieder zu Neuinfektionen bei (KRÜGER et al. 1998). Mittels Infrarotspektroskopie konnten 2 Subspecies in den Isolaten nachgewiesen werden und ein Fortbestehen der Infektion im Bestand über die kontaminierte Umgebung der Kälber bewiesen werden. Dem gegenüber messen KIRKBRIDE et al. (1972) *C. glabrata*, die aus dem Vormagen und dem Labmagen eines im 6. Trächtigkeitsmonat abortierten Kälberfetus isoliert wurden, keine pathogene Bedeutung bei. Sie sehen in ihr nur einen obligaten Saprophyten mit geringer Pathogenität. Obwohl über die Virulenzfaktoren von pseudohyphenbildenden Arten der Gattung *Candida* sehr viel bekannt ist, liegen nur wenig Untersuchungsergebnisse zu *C. glabrata* vor. Nach KWON - CHUNG et al. (1993) ist *C. glabrata* eine der am häufigsten isolierten *Candida*species, die oft in Verbindung mit *C. albicans* anzutreffen ist. Da der Nachweis von Hefepilzen in den Faeces von Mensch und Tier in ca. 66% von Gesunden (COHEN et al. 1969) gelingt, stellt nicht dieser ein grundsätzliches Problem dar, sondern die Einschätzung der Quantität und der Pathogenität, sowie die Bewertung der Wirtsantwort (TERBRACK 2000).

Zielstellung

Hinweise aus der Praxis und eigene Untersuchungen (KRÜGER et al., 1998; TERBRACK 2000) wiesen auf eine Zunahme der Nachweishäufigkeit von Hefespezies im Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen hin. Es stellt sich hier die Frage nach den Quellen dieser Erreger. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 220 Futtermittelproben im Zeitraum vom 1.1.99 bis 30.8.00 auf ihren Gehalt von als fakultativ pathogen einzustufenden Hefen untersucht.

Material und Methoden

Aufbereitung der Futtermittel

- ⇒ 25 g Probenmaterial + 225 ml Peptonwasser
bei Zimmertemperatur 2 Stunden schütteln
(bei Heu und Stroh eine 1 %-ige Suspension herstellen)
- ⇒ Ausstrich von 100µl der geschüttelten Suspension auf Sabouraud – Agar
mit Penicillin- und Streptomycinzusatz
- ⇒ Bebrütung 2 Platten bei 30°C
1 Platte bei Zimmertemperatur
- ⇒ für quantitative Untersuchungen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt
- ⇒ Ausstrich erfolgte auf 2 Sabouraudplatten (mit AB Zusatz) es wurden je 100 µl Suspension
aufgetragen
- ⇒ Auswertung: 2.; 4.; 6. und 7. Tag

Bestimmung der Hefen

- ⇒ Chromoagar (Mast – Diagnostica)
- ⇒ Reisextraktagar
- ⇒ Api ID 32 C

- ⇒ Bunte Reihe mit: Arabinose, Saccharose, Trehalose, Raffinose, Xylose
Sorbit, Galactose, Maltose, Lactose, Glucose.

Untersuchte Futtermittel

Zur Auswertung kamen 220 Futtermittelproben, davon zählten 27 Proben zu Rauhfutter, 141 zu Kraftfutter und 27 zu Futtersuppen und Naßschnitzel sowie 22 mal Biertreber. Drei Futtermittel waren als Totale – Misch – Ration (TMR) für Rinder ausgewiesen.

Ergebnisse

Bei den Rauhfuttermitteln handelt es sich um Grassilagen (n 7) und Maissilagen (n 14) sowie Heu (n 3) und Stroh (n 3). Die Ergebnisse des Hefenachweises sind in Diagramm 1 und 2 dargestellt.

Diagramm 1

Hefenachweis in Silage (Gras n 7 und Mais n 14) Zeitraum 1.1.1999 bis 30.8.2000

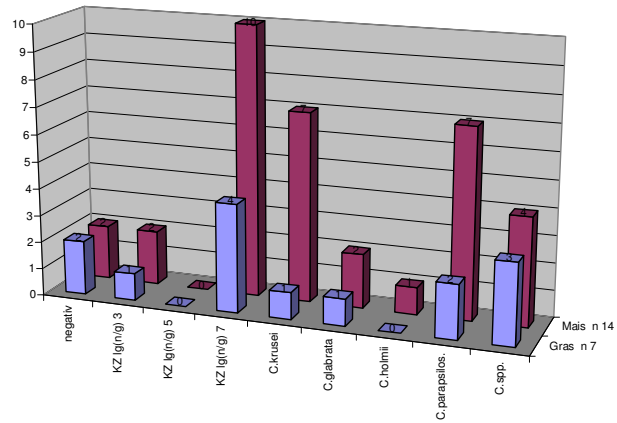
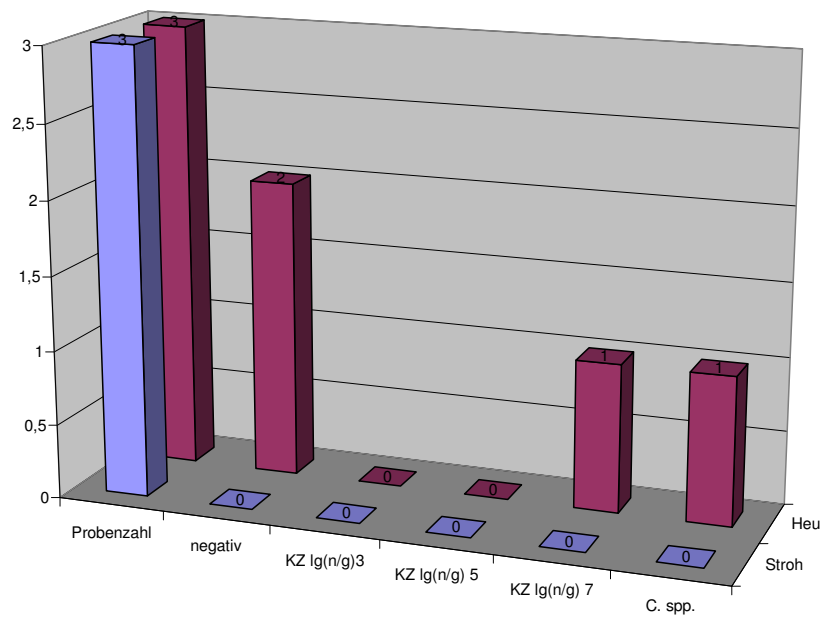


Diagramm 2

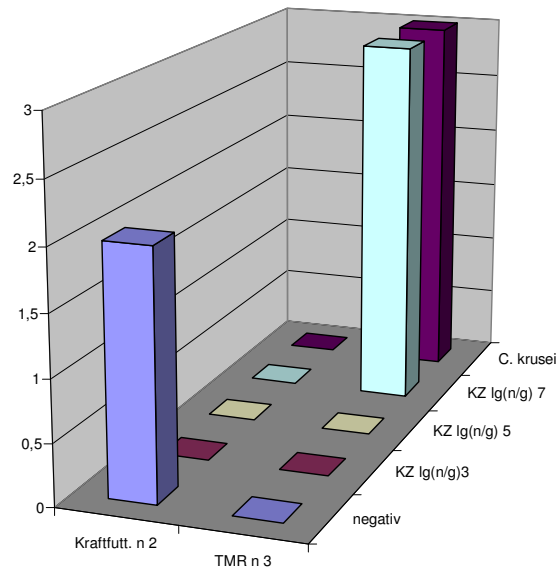
Hefenachweis in Heu (n 3) und Stroh (n 3) im Zeitraum 1.1.1999 bis 30.8.2000



Kraffutter (n 2) für Rinder und TMR (n 3) sind in Diagramm 3 ausgewertet.

Diagramm 3

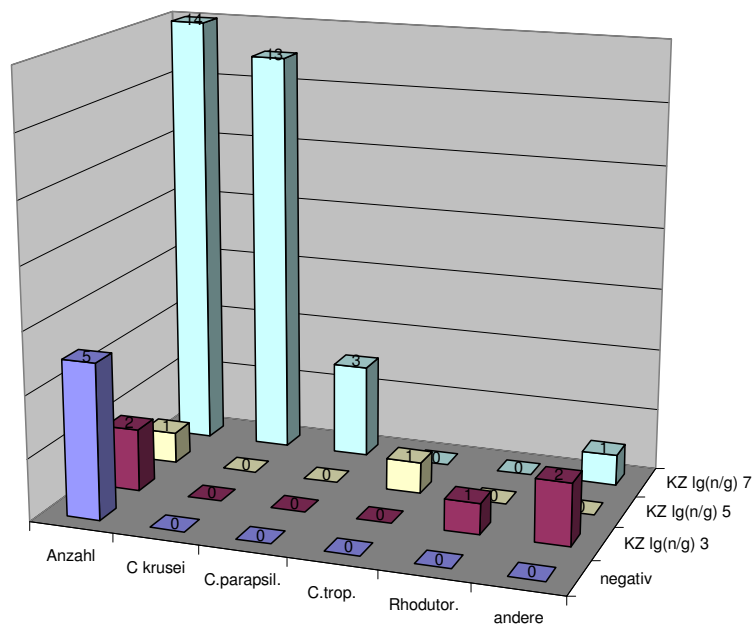
Hefenachweis in Kraftfutter und TMR für Rinder Zeitraum 1.1.1999 bis 30.8.2000



Der Hefenachweis der 22 Biertreberproben ist aus Diagramm 4 zu sehen.

Diagramm 4

Hefenachweis aus 22 Biertreberproben Zeitraum 1.1.1999 bis 30.8.2000



Bei den Kraftfuttermitteln wurden die Einzelfuttermittel wie Gerste (n 18), Hafer (n 3), Weizen (n 9), Mais (n 4), Triticale (n3) und Soja (n 9) zusammengefaßt (Diagramm 5) und das Artenspektrum der nachgewiesenen Hefen ist in Diagramm 6 dargestellt. Mischfuttermittel wurden wenn möglich den Tierarten zugeordnet.

Diagramm 5

Hefenachweis aus verschiedenen Getreidearten und aus Soja (Zeitraum 1.1.1999 bis 30.8.2000)

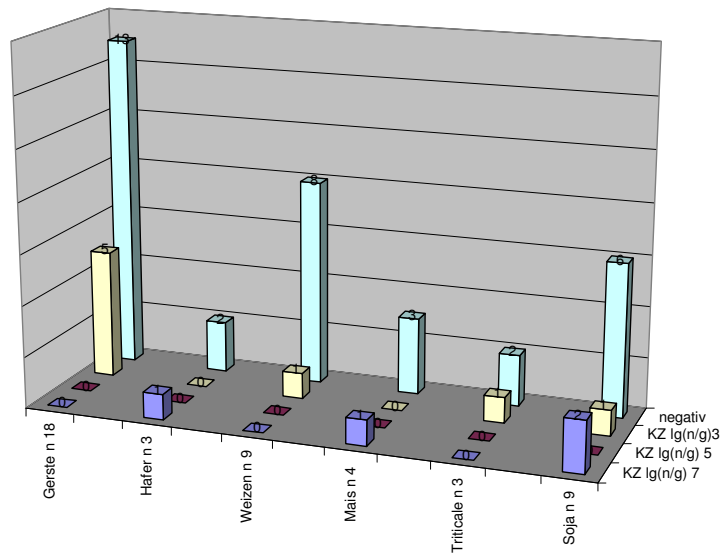
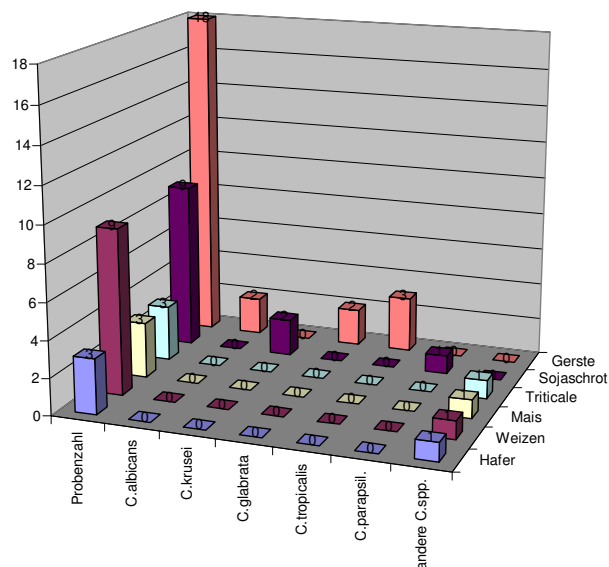


Diagramm 6

Nachgewiesene Hefearten in verschiedenen Getreidearten und Soja Zeitraum 1.1.1999 bis 30.8.2000



Die Ergebnisse der Hefenachweise in Ferkel- (n 11) und Sauenfutter (n 24) sind in Diagramm 7, die der Futtersuppe (n19) und der Naßschnitzel (n8) in Diagramm 8 dargestellt.

Diagramm 7

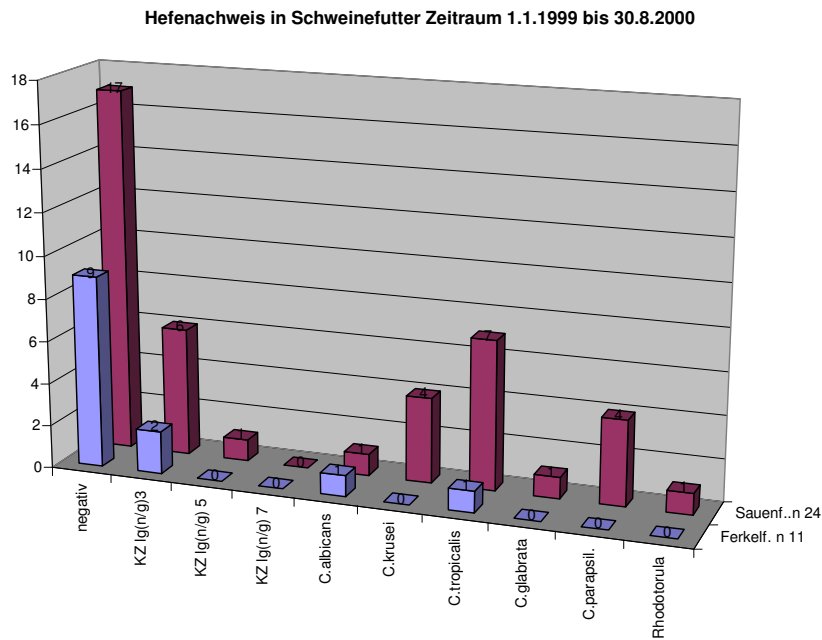
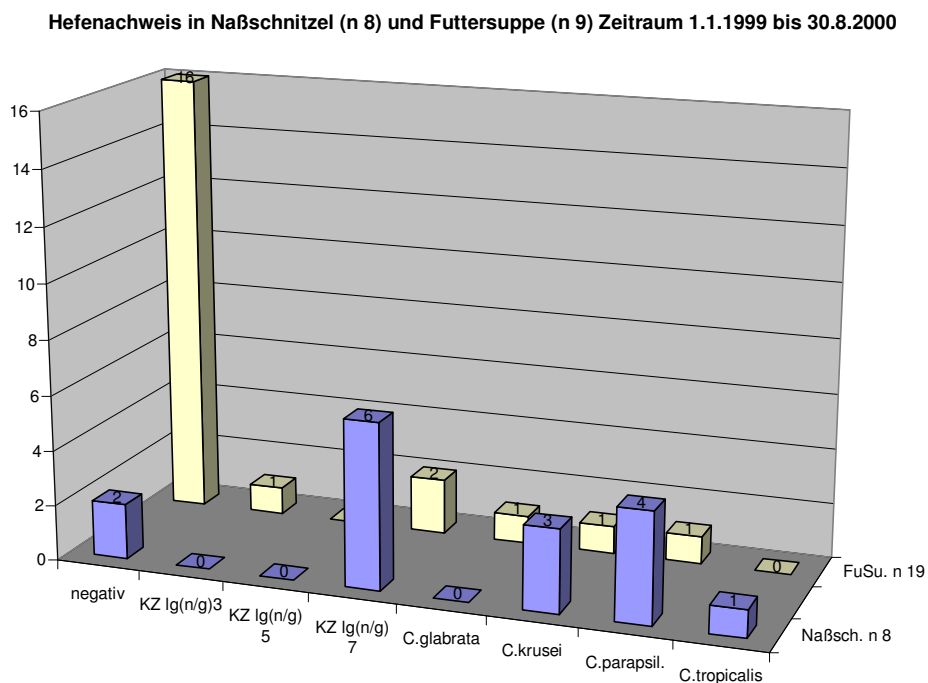


Diagramm 8



Kraftfutterpellets (ohne Zuordnung zu einer Tierart) sind in Diagramm 9 ausgewertet. Leider waren zu 52 Kraftfutterproben keine näheren Angaben zu erhalten, die Ergebnisse dieser Proben sind in Diagramm 10 dargestellt.

Diagramm 9

Hefenachweis in 6 Proben von Kraftfutterpellets Zeitraum 1.1.1999 bis 30.8.2000

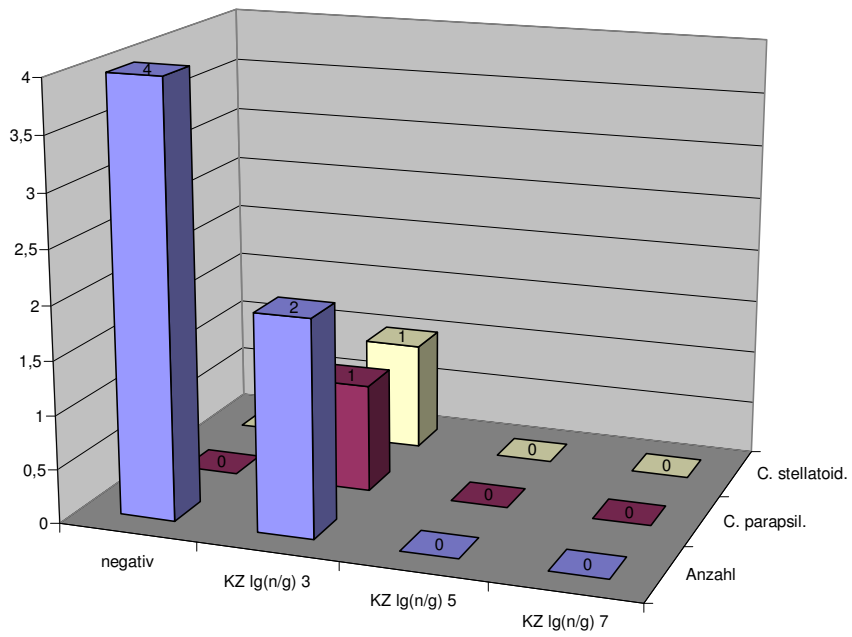
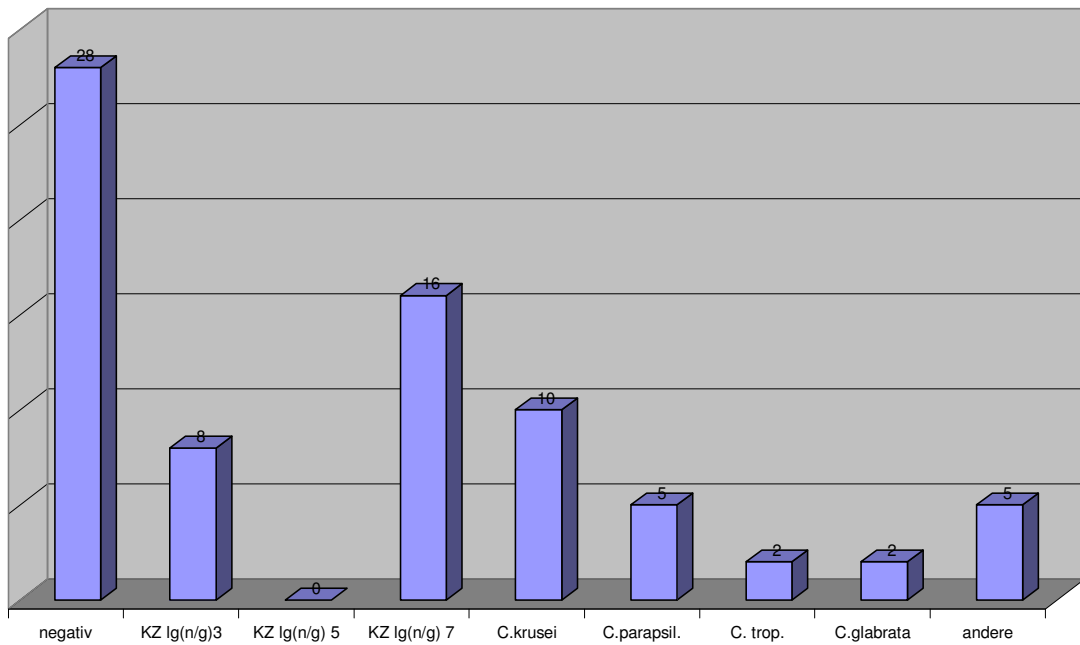


Diagramm 10

Hefenachweis aus 52 nicht näher beschriebenen Kraftfutterproben Zeitraum 1.1.1999 bis 30.8.2000



Diskussion der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass Hefen häufig in Futterproben nachzuweisen sind und daß fast alle Arten als fakultativ pathogen eingestuft werden können.

Von den 14 Maissilagen waren 10 Proben mit einer Keimzahl von 10^7 KBE Hefen / g Material positiv, während die Untersuchung von Körnermais bei nur einer von 4 Proben Hefen aufwies.

KOCH et al. haben schon 1977 auf den Zusammenhang der geringen Haltbarkeit der Silage durch starke Selbsterwärmung vieler Silagen (besonders Mais) hingewiesen und haben Untersuchungen über die Mikroflora der Maispflanzen im Laufe der Vegetationsperiode bis zum Silieren durchgeführt, um Aussagen über die Ausgangsflora (produktspezifischer Keimbesatz) machen zu können. Sie fanden heraus, daß ab Juli bzw. August (von Witterung abhängig) beträchtliche Mengen an Hefen auf den Maispflanzen zu finden waren.

Die Zahl der Hefen nimmt mit der Pflanzenentwicklung zu und erreicht Werte von $10^6 - 10^7$ KBE/g Material, also einen Bereich, der bei Heu und Stroh laut EFMO 1999 als erhöht angesehen wird.

Interessant ist die Tatsache, daß der Keimgehalt an Blatt und Stengel höher ist als an den Kolben.

Diese Ergebnisse können auch durch unsere Untersuchungen (Diagramm 1 und 5) belegt werden.

Bei Gärfutter (wie Silagen) sind die Nährstoffverluste durch Veratmung des Zuckervorrates und durch Hydrolyse und Desaminierung von Eiweißen z.T. recht groß.

Erhebliche Nährstoffverluste entstehen auch bei Nachgärungsvorgängen die vor allem durch Hefen bedingt sind. Der Hefegehalt der Silage erhöht sich nach dreitägiger aerober Lagerung um zwei Zehnerpotenzen, was beim Probentransport berücksichtigt werden sollte. Auch TERBRACK (2000) weist darauf hin, daß die Hefekonzentration in gelagerten Kotproben instabil ist und empfiehlt eine Lagerung der Proben bei $+4^\circ\text{C}$.

Die Untersuchungen von Koch und Mitarb. (1977) ergaben, daß 10 – 20% der über die Vegetationsperiode isolierten Hefen kahmhautbildende Stämme waren. Auch in unseren Untersuchungen wurden kahmhautbildende Hefen (*C. krusei*) neben *C. parapsilosis* (Diagramm 1) häufig aus Maissilagen isoliert, wobei *C. krusei* nicht aus dem Körnermais nachgewiesen werden konnte (Diagramm 5). HERFORD u. JAKOBSON (1999) fanden bei spontan fermentierten Maisteig vor allem *Saccharomyces cerevisiae* und *C. krusei* und schlossen daraus, daß diese Hefen zur produktspezifischen Flora gehört. PCR – Untersuchungen zeigten, daß verschiedene Stämme von *C. krusei* bei der Fermentation von Maisteig beteiligt waren, und das Unterschiede zwischen Stämmen aus klinischen Isolaten und Nahrungsmitteln bestanden.

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchungen der Getreidearten so fällt auf, daß hier relativ wenig Hefen isoliert werden konnten. Die Negativbefunde lagen i.d.R. über 60%, wobei der Weizen die besten Ergebnisse brachte.

Bei der Auswertung der Differenzierung der Hefearten fällt auf, daß sowohl *C. albicans*, als auch *C. krusei*, *C. glabrata* und *C. tropicalis* häufiger vertreten sind.

Die Beurteilung der anderen Futtermittel ergab, daß Biertreber (Diagramm 4) und TMR für Rinder (Diagramm 3) am meisten mit Hefen belastet sind. Auffallend war, daß auch hier *C. krusei* dominierte.

Die Dominanz von *C. krusei* war ebenfalls in Kraftfutterproben ohne genaue Zertifizierung zu beobachten..

Die Pelletierung des Kraftfutters, bei der durch den Pelletiervorgang eine Erhitzung der Einzelkomponenten erfolgt, führt nicht zu einer vollständigen Eliminierung der Hefen. Obwohl sich eine Reduzierung des Keimgehaltes, alle Proben $\leq 10^3$ KBE/ g Material, angedeutet.

Bei Ferkelfutter (Diagramm 7) war ein niedriger Hefegehalt zu verzeichnen obwohl die nachgewiesenen Hefearten (*C. albicans* und *C. tropicalis*) über ein großes Virulenzpotential verfügen.

Möglichkeiten der Infektion für das Ferkel sind aber auch über das Sauenfutter gegeben, das bei unseren Untersuchungen (Diagramm 7) höher belastet war als das Ferkelfutter.

Auch bei Futtermitteln wie Naßschnitzel und Futtersuppe, sowie der nicht näher beschriebenen Kraftfutterproben, konnte *C. krusei* häufig isoliert werden. Damit kann *C. krusei* als die im Futter am häufigsten nachgewiesene Hefeart angesehen werden. In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob Unterschiede zwischen den Stämmen die aus Futter und solchen die aus klinischen Isolaten stammen bestehen, und ob es Gemeinsamkeiten zwischen Stämmen aus Futtermitteln und Nahrungsmitteln gibt.

Schlußfolgerungen

Futtermittel sind sehr häufig mit fakultativ pathogenen Hefen kontaminiert.

Rauhfuttermittel waren am stärksten mit Hefen belastet.

Silagen, besonders Maissilagen weisen hohe und höchste Hefekonzentrationen auf.

Aus Silagen unter Zusatz von konzentrierten Futtermitteln, wie Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen, hergestellte Futtermischungen (Totale - Misch- Ration) garantieren zwar für den Wiederkäuer eine gleichmäßig stabile Futtermischung, bergen aber die Gefahren in sich, daß Hefen in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur und dem Sauerstoff, sich exzessiv vermehren und die Tiergesundheit negativ beeinflussen.

Kraftfuttermittel für Schweine und Rinder (Cerealien, Soja und Futtermischungen) sowie Kraftfütterpellets waren in unseren Untersuchungen zu 33 % mit Hefen belastet.

Aus Futtermischungen und feuchtem Tierfutter (Biertreber) waren Hefen in 55% nachzuweisen.

C. krusei wurde in den Futtermitteln als häufigste Hefeart nachgewiesene.

Die Diagnostik von Hefen sollte nicht nur quantitative Verhältnisse charakterisieren. Für die Beurteilung der pathogenetischen Bedeutung von Hefen für landwirtschaftliche Nutztiere ist die Speziesdiagnostik eine unverzichtbare Voraussetzung.

Standardisierte Entnahme – und Transportbedingungen sowie ein entsprechendes Standardlaborprotokoll zur Diagnostik sind die Voraussetzungen für vergleichbare Untersuchungen.

Literatur bei den Verfassern

Molekularbiologische Typisierung von *Candida albicans* praktische Tips für das Genlabor

Anke Edelmann

Institut für Biochemie des Universitätsklinikums Leipzig

NJ

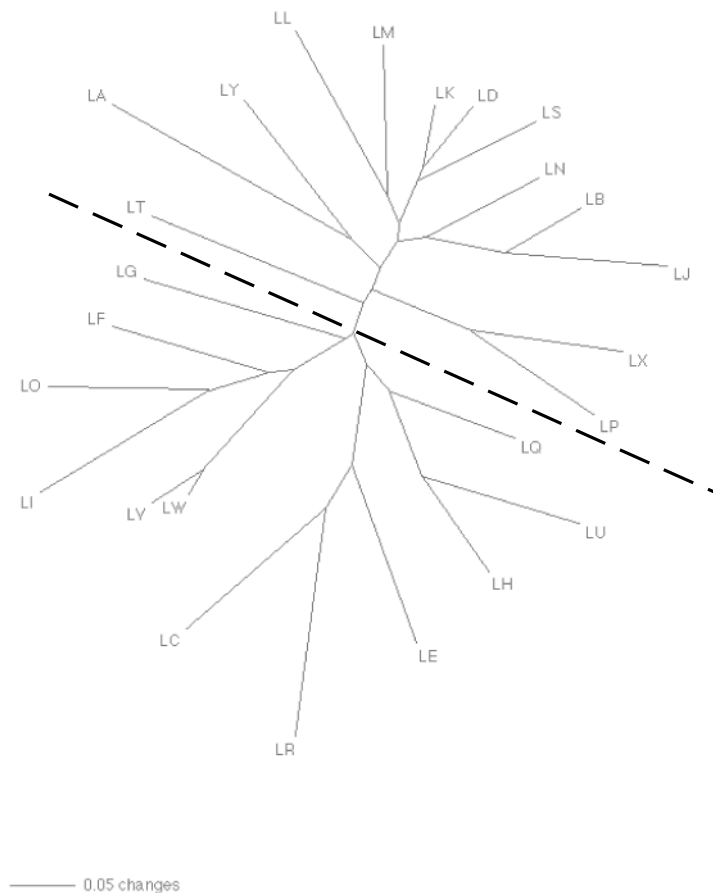


FIG. 2. Genetic relationships among all *C. albicans* isolates determined on the basis of the similarity of their Ca3 fingerprinting. The circles in the dendrogram denote the fluconazole resistant strains. The line in the middle shares the strains into two groups which show a different frequency of resistance.

Bei der Charakterisierung von Erregern im Zusammenhang mit Pilzinfektionen erfolgt die Identifizierung der Spezies in der traditionellen Mikrobiologie anhand von taxonomischen Markern. Molekulare Typisierungsverfahren sind ein geeignetes Hilfsmittel in der molekularen Mykologie, um auch einzelne Stämme voneinander zu unterscheiden und z.B. deren epidemiologische Verwandtschaften aufzuzeigen, nosokomiale Infektionen oder einen Wechsel von den Patienten besiedelnden Stämmen unter der Therapie mit Antimykotika nachzuweisen. Besonders für den fakultativ pathogenen und medizinisch sehr interessanten Erreger *C. albicans* findet man in der Literatur eine Reihe von Methoden und Ergebnisse molekularer Typisierungsverfahren. Dabei kommen Verfahren wie die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP), DNA-Fingerprinting-Verfahren und Hybridisierungen mit repetitiven DNA-Elementen zur Anwendung.

Bei der Hybridisierungsmethode unter Verwendung der mäßig repetitiven, *C. albicans*-spezifischen Ca3-Sequenz als DNA-Sonde handelt es sich um ein sehr sensibles, reproduzierbares und schnelles Verfahren. Jenes beinhaltet die Analyse der *C. albicans*-DNA mittels Southern Blot in Verbindung mit einer

Computer-gestützten Auswertung der erhaltenen Bandenmuster. Die Verwandtschaftsbeziehungen der untersuchten Isolate können in einem Dendrogramm dargestellt werden.

Methode der Southern Blot Analyse

Das Southern Blotting ist ein Verfahren, bei dem DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und anschließend aus der Gelmatrix des Trenngels auf eine geeignete Trägermembran aus Nitrocellulose oder Nylonmembran übertragen und dort immobilisiert werden. Bei dem Transfer bleibt das im Gel erhaltene Trennmuster der DNA-Fragmente erhalten. Um ein bestimmtes DNA-Fragment auf der Membran sichtbar zu machen, bedient man sich der Hybridisierung einer *Sonde*, d.h. der sequenzspezifischen Bindung einer markierten Nukleinsäure.

Material und Methoden

1. Kultivierung der Hefen

10 ml YEPD-Medium (*yeast extract pepton dextrose*) werden mit einer Kolonie des zu untersuchenden Hefestammes beimpft und über Nacht bei 30°C und 250 U/min inkubiert.

YEPD -Medium, pH 6.5

- 1% Hefeextrakt (*Select Yeast Extract*, GibcoBRL)
- 2% Pepton (*BACTO™ Pepton*, DIFCO)
- 2% Glucose (extra autoklavieren)

(2% Agar zur Herstellung von Agarplatten; *Select Agar*, GibcoBRL)

Isolation genomischer DNA aus Hefe

Für die Isolation von DNA aus Hefe findet man in der Literatur verschiedene Protokolle. In jedem Fall ist es notwendig, zunächst die Zellwand der Hefezellen ganz oder teilweise zu entfernen, d.h. Hefe-Protoplasten herzustellen.

Die folgende Vorschrift hat sich für die Isolation von genomischer DNA aus *C. albicans* als geeignet erwiesen.

1) Herstellung von Hefe-Protoplasten

- Zentrifugation von 5 ml Hefe-Übernachtskultur für 10 min mit 4 000 U/min
- Überstand verwerfen
- Zellen in 1 ml H₂O_{bidest} aufnehmen und in Eppendorfbecher überführen
- Zentrifugation für 10 min mit 4 000 U/min oder für 1 min mit 13 000 U/min
- Überstand vollständig abnehmen und verwerfen
- Zellen in 0,4 ml SCE-Mix resuspendieren
- Inkubation für 1-2 h bei 37°C unter starkem Schütteln (im Thermomixer)

Lösungen zur Herstellung von Protoplasten:

SCE-Puffer, pH 7.5 (steril)	1,00 M Sorbitol 0,10 M Na-Citrat 0,06 M EDTA
SCE-Mix	10,00 ml SCE-Puffer 2,00 mg Lyticase (aus <i>Arthrobacter luteus</i> , 200-1 000 U/mg, SIGMA) 0,08 ml 2-Mercaptoethanol

2) DNA-Isolation

- Protoplasten mit 0,4 ml Lyse-Puffer versetzen, gut mischen (nicht vortexen) und 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Zugabe von 0,1 ml NaCl, mischen (nicht vortexen)
- Lagerung für 2 h bei 8°C (Kühlschrank)
- Zentrifugation für 12 min bei 4°C und 17 000 U/min
- Überstand vorsichtig abgießen
- Pellet in 0,4 ml TE-Puffer suspendieren (nicht zu viel pipettieren, sonst Scheren der hochmolekularen DNA!)

- Phenol/Chloroform-Extraktion:
 - 0,4 ml Phenol zugeben, gut mischen (nicht vortexen)
 - zentrifugieren für 5 min mit 13 000 U/min
 - obere Phase vorsichtig abnehmen und mit gleichem Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzen, mischen
 - zentrifugieren für 5 min mit 13 000 U/min
 - obere Phase vorsichtig abnehmen und mit gleichem Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol versetzen, mischen
 - obere Phase vorsichtig abnehmen und mit doppeltem Volumen an absolutem Ethanol versetzen, vorsichtig mischen
- ausgefällte DNA ist als weißer Faden sichtbar, wird aufgewickelt (auf Glasstab oder Spitze von Eppendorfpipette) und in Eppendorfbecher mit frischem Ethanol überführt (DNA eines Hefestammes aus zwei parallelen Präparationen kann hier vereint werden)
- Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 17 000 U/min, Überstand vorsichtig abgießen
- Pellet mit 70% (v/v) Ethanol sowie anschließend mit absolutem Ethanol waschen (je 5 min zentrifugieren mit 17 000 U/min und 4°C, Überstand vorsichtig abgießen)
- DNA-Pellet lufttrocknen
- DNA in ca. 50 µl sterilem H₂O_{bidest} oder TE-Puffer über Nacht im Kühlschrank lösen
- falls gewünscht, die in der DNA-Probe enthaltene RNA durch RNase-Behandlung und erneute Phenol/Chloroform-Extraktion abtrennen
- 2 µl DNA-Probe zur Kontrolle von Quantität und Qualität in einem 0,8%-igen Agarose-Minigel auftrennen

Lösungen für die DNA-Isolation:

Lyse-Puffer, pH 9,0	500 mM Tris 200 mM EDTA 2,0% (w/v) SDS
NaCl	5,0 M
TE-Puffer, pH 8,0	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA
Phenol	mit TE-gesättigt (Roti- Phenol, Roth)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	25:24:1, mit TE-gesättigt (Roti- Phenol/Chloroform, Roth)
Chloroform/Isoamylalkohol	24:1
Ethanol	absolut (Baker)

3. Restriktionsverdau der DNA

Die hochmolekulare genomische DNA wird mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease in definierte Fragmente gespalten.

Für das Ca3-Fingerprinting wird die DNA mit *EcoRI* geschnitten.

Beispiel für einen Reaktionsansatz mit Gesamtvolumen von 30 µl:

- 5,0 µg genomische DNA
- 2,5 µl Restriktionsendonuklease
- 3,0 µl Restriktionsendonuklease-Puffer (10-fach konzentriert)
- n µl H₂O_{steril}

4. DNA-Agarosegel-Elektrophorese

Im Anschluß an den Restriktionsverdau erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem max. 5 mm dicken 0,8%-igen Agarosegel. Die entsprechende Menge an Agarose und 1x TAE-Puffer wird in einer Mikrowelle erhitzt, bis eine klare Lösung vorliegt. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wird diese auf den Gelträger einer horizontalen Elektrophoresekammer gegossen und der Kamm zur Formung der Auftragungsschlitze eingesetzt. Die Auswahl des Kammes erfolgt unter Berücksichtigung der Zahl der aufzutrennenden Proben und deren Volumina. Je nach Gelgröße kann nach 30-60 min die Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt werden, bis das feste Gel gerade mit Puffer bedeckt ist. Nach dem vorsichtigen Entfernen des Kammes werden die DNA-Proben mit Probenpuffer (¹/₁₀ Volumenanteil) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophoresebedingungen werden entsprechend der Gelgröße gewählt und die DNA in Richtung Anode aufgetrennt (Minigel: 100 V, ca. 30 min; großes Gel: 30 V, ca. 20 h). Nach Färbung der DNA im Ethidiumbromidbad (ca. 15 min) kann diese mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Lösungen für Agarosegel-Elektrophorese:

TAE-Puffer, pH 8.3 50x Stammlösung: 1x konzentriert einsetzen!	2,0 M Tris-Base 1,0 M Acetat 0,1 M EDTA
Probenpuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 15% (v/v) Ficoll
Ethidiumbromid-Stammlösung: Färbegrad:	10 mg/ml H ₂ O _{bidest} ca. 50 µl Stammlösung in 1 l H ₂ O
Agarose (ultraPURE, electrophoresis grade, GibcoBRL)	0,8% (w/v) in 1x TAE-Puffer

5. Transfer der DNA auf eine Nylonmembran

Eine geeignete Methode zur Übertragung elektrophoretisch aufgetrennter Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran ist der Transfer mittels Vakuum unter Verwendung des VacuGene XL Vacuum Blotting Systems (amersham pharmacia biotech).

Ein entsprechendes Protokoll umfaßt folgende Arbeitsschritte:

- **Nylonmembran und Agarosegel nur mit Handschuhen anfassen!**
- Agarosegel kurz in H₂O_{bidest} waschen
- Eine positiv geladene Nylonmembran zuschneiden (etwas größer als Gel)
- Geeignete Maske auswählen (Öffnung muß etwas kleiner als Agarosegel sein)
- Anfeuchten des Screens mit H₂O_{bidest}
- positiv geladene Nylonmembran von einer Seite her luftblasenfrei auf angefeuchteten Screen legen (Membran muß sich dabei gleichmäßig anfeuchten, Position genau unter Öffnung der Maske)
- Vakuum anlegen

- Blottingkammer vollständig zusammenbauen
- Gel vorsichtig von einer Seite her luftblasenfrei über Öffnung in Maske auf Nylonmembran legen, daß diese vollständig verschlossen wird
- Vakuum auf max. 50 mbar einstellen
- Agarosegel nacheinander je 10 min zum
 - *Depurinierung
 - *Denaturieren
 - *Neutralisieren
 mit den entsprechenden Lösungen überschichten
- Transfer genomischer DNA auf die Nylonmembran mit 20x SSC für 1,5 h
- Gel entfernen, dann Vakuum abstellen
- Kammer auseinander bauen
- Nylonmembran waschen mit H_2O_{bidest}
- Membran an Luft trocknen
- Fixierung der DNA an der Nylonmembran mittels UV-Licht für 3 min (= cross-linken)
- Nylonmembran mit DNA kann für längere Zeit gelagert werden

Lösungen für DNA-Transfer:

positiv geladene Nylonmembran	z.B. Roche Diagnostics GmbH
Depurinierungslösung	0,25 N HCl
Denaturierungslösung	1,50 M NaCl 0,50 M NaOH
Neutralisierungslösung pH 5.0	1,00 M Tris 2,00 M NaCl
20x SSC, pH 7,0 - 7,2 (20-fach konzentriert) autoklavieren	175,3 g NaCl (sodium chloride) 88,2 g Na-Citrat (sodium citrate) in 1 l H_2O

6. Herstellen einer DNA-Sonde - DNA-Markierung mit Digoxigenin

Voraussetzung für die Markierungsreaktion ist die Isolierung einer für die spezifische Hybridisierung geeigneten Nukleinsäure in ausreichender Qualität und Quantität.

Letzteres kann man photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm unter Verwendung von Quarzküvetten abschätzen.

Nach Sambrook et al. (1989) gilt für doppelsträngige DNA:

$A_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ (eingesetzte Verdünnung berücksichtigen!)

$A_{260}/A_{280} > 1,6$ ist Ausdruck für eine hinreichende Reinheit der DNA.

Eine geeignete Methode zur nicht-radioaktiven Markierung von DNA ist das *random primed labeling*, wobei mit Digoxigenin markiertes Desoxyuridintriphosphat (DIG-dUTP) nach dem Zufallsprinzip in die neusynthetisierte DNA eingebaut wird.

Der Markierungsansatz unter Verwendung des *DIG DNA Labeling- und Detection Kit* (Roche Diagnostics GmbH) setzt sich wie folgt zusammen:

- ca. 2 µg frisch denaturierte DNA
- 2 µl Hexanukleotidgemisch
- 2 µl dNTP-Markierungs-Mix
- 1 µl Klenow-Enzym

Gesamtvolumen: 20µl

Der Markierungsansatz wird auf Eis pipettiert und anschließend für ca. 20 h bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8,0) wird die Sonde mit 2,5 µl LiCl (4M) und 75 µl Ethanol (absolut) in Gegenwart von 1 µl Glykogen für 2 h bei -20°C gefällt. Das durch Zentrifugation bei 17 000 U/min für 15 min erhaltene Pellet wird mit 70%-igem und absolutem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst.

7. Hybridisierung und Detektion

Die optimale Prä- und Hybridisierung erfolgt unter Drehen im Hybridisierungssofen.

Die Temperatur für Prä- und Hybridisierung sowie die nachfolgenden Waschbedingungen hängen von den Eigenschaften der eingesetzten Sonde ab.

1) Prähybridisierung

- Nylonmembran mit daran fixierter DNA bei geeigneter Temperatur mit 20 ml Hybridisierungslösung pro 100 m² Membranfläche mind. 1h inkubieren
- Bei Verwendung einer homologen DNA-Sonde wie der Ca3-Sonde für DNA aus *C. albicans* sind 68°C optimal (eine heterologe Sonde erfordert eine niedrigere Temperatur)

Membran darf nicht mehr austrocknen!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

2) Hybridisierung

- DNA-Sonde durch 10 min Kochen im Wasserbad und umgehendes Lagern auf Eis denaturieren
- Prähybridisierungslösung durch 2.5 ml Hybridisierungslösung pro 100 m² Membranfläche ersetzen, die 10 - 100 ng frisch denaturierte Sonde pro ml Hybridisierungslösung enthält
- Hybridisierung über Nacht bei geeigneter Temperatur
Bei Verwendung der homologen Ca3-Sonde für *C. albicans* DNA sind 68°C optimal. (eine heterologe Sonde erfordert eine niedrigere Temperatur)

3) Waschen

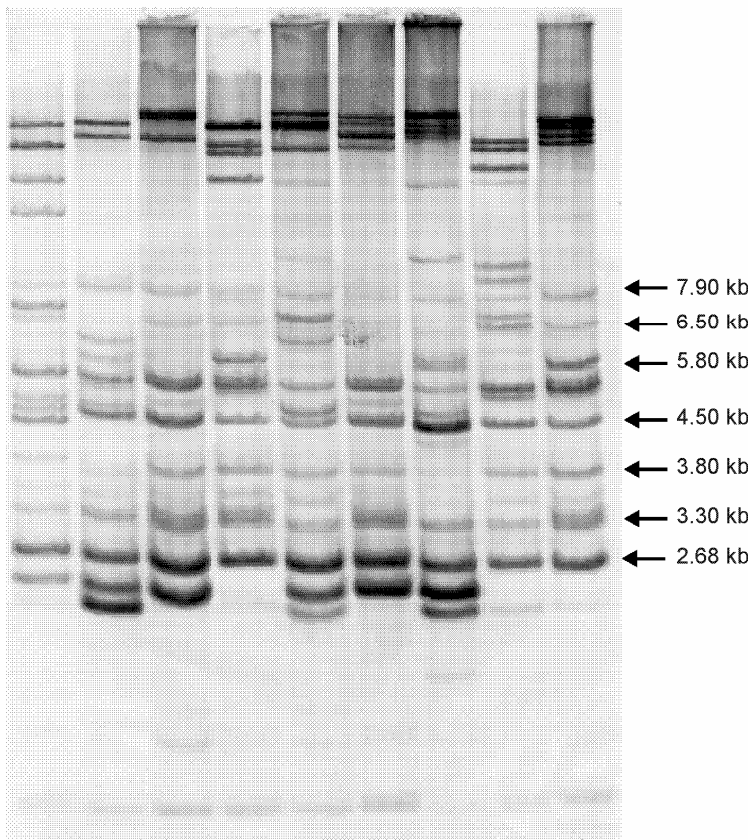
- jeweils 50 ml Lösung verwenden
 - bei Verwendung einer homologen DNA-Sonde wie der Ca3-Sonde können stringente Bedingungen gewählt werden:
 - a) 2x 5 min bei RT mit 2x SSC / 0,1% SDS
 - b) 2x 15 min bei 68°C mit 1x SSC / 0,1% SDS
- (eine heterologe Sonde erfordert bei Schritt 3a und b) 2x SSC / 0,1% SDS)

4) Immunologischer Nachweis und Farbdetektion

Die Schritte werden bei RT (Raumtemperatur) unter schwachem Schütteln durchgeführt. Das Volumen der eingesetzten Lösungen hängt von der Größe der Membran ab.

Die Nylonmembran muss stets vollständig bedeckt sein!

AU52 G K M Q S T U 3153A



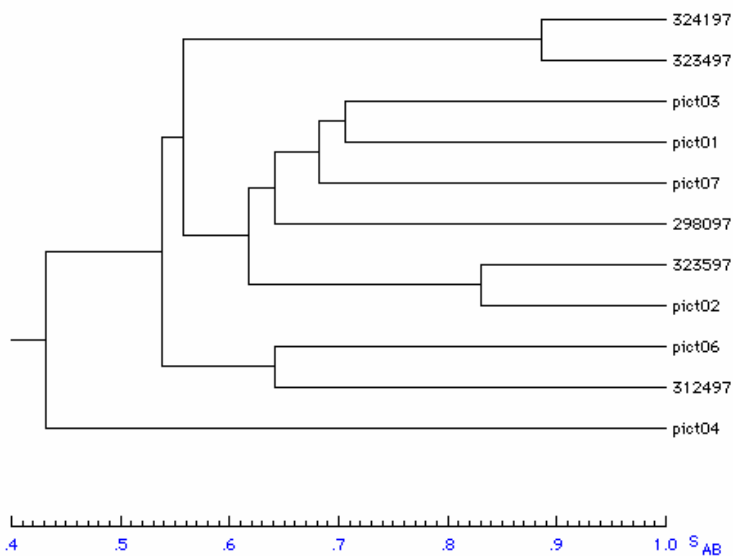
- 1 min in ca. 50 ml Maleinsäurepuffer* waschen
- mind. 1h in ca. 100 ml 1% Blockierungslösung inkubieren
- 30 min in 30 ml 1% Blockierungslösung mit Anti-DIG - AP-Konjugat inkubieren (30 ml + 6 µl = 1: 5000)
- ungebundenes Konjugat durch 2x 15 min waschen mit je 100 ml Maleinsäurepuffer* entfernen
- 2 min in 50 ml AP-Puffer inkubieren
- Färbelösung (frisch herstellen!):
 - 66 µl NBT
 - 33 µl BCIP
 - 10 ml AP-Detektionspuffer
- im Dunkeln stehen lassen oder Membran mit Färbelösung in Plastfolie einschweißen (max. 24 h)
- wenn Signale auf der Nylonmembran deutlich sichtbar sind, Reaktion mit TE-Puffer oder H₂O_{bidest} abstoppen
- Membran trocknen und Ergebnis dokumentieren

FIG.1. Southern Blot Analyse mit Ca3 von verschiedenen *C. albicans* Isolaten und von zwei Laborstämmen, die als Standard genutzt werden.

Lösungen für Hybridisierung und Farb-Detektion

Hybridisierungslösung	5x SSC 1,00% (w/v) Blockierungslösung 0,10% (w/v) N-Laurylsarcosin 0,02% (w/v) SDS in H ₂ O
Blockierungslösung 10%ige Stammlösung (vorsichtig in Mikrowelle lösen, autoklavieren, im Kühlschrank lagern)	10 g Blockingreagenz (Roche Diagnostic GmbH) in 100 ml Maleinsäurepuffer*
Mit Digoxigenin markierte DNA-Sonde	
SSC Stammlösung 20x SSC, pH 7,0 - 7,2	175,3 g NaCl (sodium chloride) 88,2 g Na-Citrat (sodium citrate) in 1 l H ₂ O
Maleinsäurepuffer, pH 7.5 (pH vorsichtig mit NaOH-Plättchen einstellen, dann erst mit H ₂ O auffüllen, autoklavieren, bei RT lagern)	0.10 M Maleinsäure 0.15 M NaCl

Maleinsäurepuffer*	Maleinsäurepuffer mit 0,3% Tween20
Anti-DIG-AP	Anti - Digoxigenin - Alkalische Phosphatase; Fab Fragmente (Roche Diagnostics GmbH)
AP-Detektionspuffer, pH 9.5 (autoklavieren, lagern bei RT)	100 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
NBT-Lösung (Nitro-Tetrazolium-Blau)	Roche Diagnostics GmbH
BCIP-Lösung (4-toluidinsalz)	Roche Diagnostics GmbH



Literatur

- Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual.*, 2. ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Grunstein et al. (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3961-3965
- Vogeli, G. & Kaytes, P.S. (1987) *Methods Enzymology* **152**, 407-415
- Bertram, S. & Gassen, H.G. (1991) *Gentechnische Methoden*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie (FT-IR) zur Identifizierung von Pilzen im mikrobiologischen Labor

Dr. Arno Schmalreck – MBS (Mikrobiologischer BeratungService München)

Einführung

Obwohl der Infrarotbereich des elektromagnetischen Spektrums bereits 1800 durch William Herschel entdeckt wurde, ist die "Vibrationsspektroskopie" (Infrarot- und Ramanspektroskopie) ein relativ junges Forschungswerkzeug, dessen Autonomie 1945 mit der Publikation von "Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules" durch Gerhard Herzberg begann. 1949 wurde die erste Publikation zur Anwendung der IR-Spektroskopie in biologischen Systemen veröffentlicht (Science **110**: 137-138). Aufgrund der Grenzen, die damals eingesetzten dispersiven IR-Geräte hatten, verschwand die IR-Spektroskopie im biologisch-medizinischen Bereich wieder von der Bildfläche. Als bedeutender Meilenstein für den verbreiteten Einsatz der Vibrationsspektroskopie war die Einführung neuer IR-Datenverarbeitungstechniken, in der Hauptsache die Bandenverkleinerung durch die in die Software eingebundene Fourier-Transformation, sowie neuere EDV-Techniken und die Entwicklung leistungsfähiger (Klein)Rechner in den 80-er Jahren. Erst Ende der 80-Jahre wurden, mit den nunmehr erheblich leistungsfähigeren FT-IR Geräten, neue Anwendungen in Biologie und Medizin erschlossen. D. Naumann (RKI, Berlin) beschrieb neue Wege für die Charakterisierung und Identifizierung von pathogenen Bakterien, basierend auf den Vibrationsspektren der Zellwände (D. Naumann et al., 1991, The characterization of micro-organisms by FT-IR spectroscopy. In: W.H. Nelson (Hrsg.), Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis, pp43-96. VCH, New York). Servas et al. (Bio-Tec **3**: 71-74; 1991) konnte zeigen, dass die Methode der FT-IR Spektroskopie auch für die Identifizierung und Differenzierung von Hefen prinzipiell sehr gut geeignet ist. Im Laufe der Jahre wurden spezielle Protokolle für die FT-IR von Sprosspilzen (Kümmerle et al., 1998, Appl. Env. Microbiol. **64**: 2207-2214; Schmalreck et al., 1998, mycoses **41**: 71-77; Schmalreck und Hotzel, 2000, mycoses **43** (Suppl. 1): 61-68) und Dermatophyten (Bastert et al., 1999, mycoses **42**:525-528) vorgestellt. Daß unter standardisierten Bedingungen bereits nach kurzer Einwirkzeit von Antibiotika auf Mikroorganismen (ca. 2-3 Generationszeiten) mittels FT-IR eine aussagefähige Differenzierung nach Wirktyp und Wirkmechanismus der untersuchten Hemmstoffe möglich ist, konnte von H. Labischinski gezeigt werden.

Grundlagen

Die Vibrationsspektroskopie liefert in nicht-zerstörender Weise Informationen über die molekulare Zusammensetzung, die molekularen Strukturen sowie von molekularen Interaktionen in Zellen. Keine Marker, Farbstoffe oder andere kontrastverstärkende Mittel werden für die Aufnahme der IR-Spektren benötigt. FT-IR und IR-Raman Spektroskopie sind komplementäre

Techniken. Verschiedene Auswahlkriterien gelten für die IR-Absorption und Raman-Streuung eines Moleküls. Zusammen ergeben die beiden Techniken einen kompletten und im höchsten Maße spezifischen "Fingerabdruck" von (intakten) Zellen.

Der infrarote Strahlungsbereich reicht von 1 µm bis 1mm. In der Regel wird die Wellenzahl (ν) als reziproker Wert der Wellenlänge als physikalische Messeinheit in der FT-IR Spektroskopie angewandt.

Der Infrarotbereich wird in einen Nah- ($\nu= 12.300 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), Mittel- ($\nu=4000-200 \text{ cm}^{-1}$) und Fernbereich ($\nu=200-10 \text{ cm}^{-1}$) eingeteilt. Für alle Untersuchungen wurde nur der mittlere IR-Bereich verwendet. Die FT-IR Spektroskopie beinhaltet die Beobachtung von Molekülvibrationen die nach Anregung durch einen Infrarotstrahl entstehen. Die Moleküle sind in der Lage die Energie bestimmter Lichtquanten zu absorbieren, worauf sie in eine Schüttel- oder Rotationsbewegung übergehen. Die FT-IR Spektroskopie verwendet nur Vibrationen die eine Änderung des Dipolmoments eines Moleküls hervorrufen.

FT-IR Spektren von intakten Zellen ergeben somit höchst spezifische, fingerabdruckartige Signaturen die verwendet werden um verschiedene Genera, Spezies, Subspezies oder Isolate auf Stammebene zu differenzieren und zu klassifizieren. Die Aufgabe Spezies- oder Stammspezifische Merkmale aus dem komplexen IR-Spektrum zu extrahieren, ist nur durch Anwendung von Korrelations- oder multivariaten, statistischen Verfahren, in Verbindung mit Clusteranalysen oder Neuronalen Netzen, möglich. Hierbei werden im Prinzip Referenzspektrum-Bibliotheken von gut charakterisierten Stämmen angelegt. Das FT-IR Spektrum eines nicht-bekanntes Stammes wird unter gleichen Bedingungen wie die Referenzspektren aufgenommen und dann mit den Spektren der Referenzbibliothek verglichen. In der Literatur gibt es inzwischen ausgezeichnete Beschreibungen von Zellkomponenten/-Struktur-Spektrum Korrelationen für die meisten biologischen Makromoleküle und bedeutenden biologischen Bildungsgruppen (Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Fettsäuren, Lipide, Pigmente). Eine detaillierte Übersicht existiert von Naumann (FT-IR and FT-Raman Spectroscopy in Biomedical Research. In: Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials, S.323-377.H-U. Gremlich und B. Yan (Hrsg.), Marcel Dekker Inc., N.Y.-Basel).

Anwendung der FT-IR Spektroskopie zur Identifizierung von Pilzen

Die nachfolgend aufgeführten Spezies konnten in eigenen Untersuchungen eindeutig charakterisiert und voneinander abgegrenzt werden:

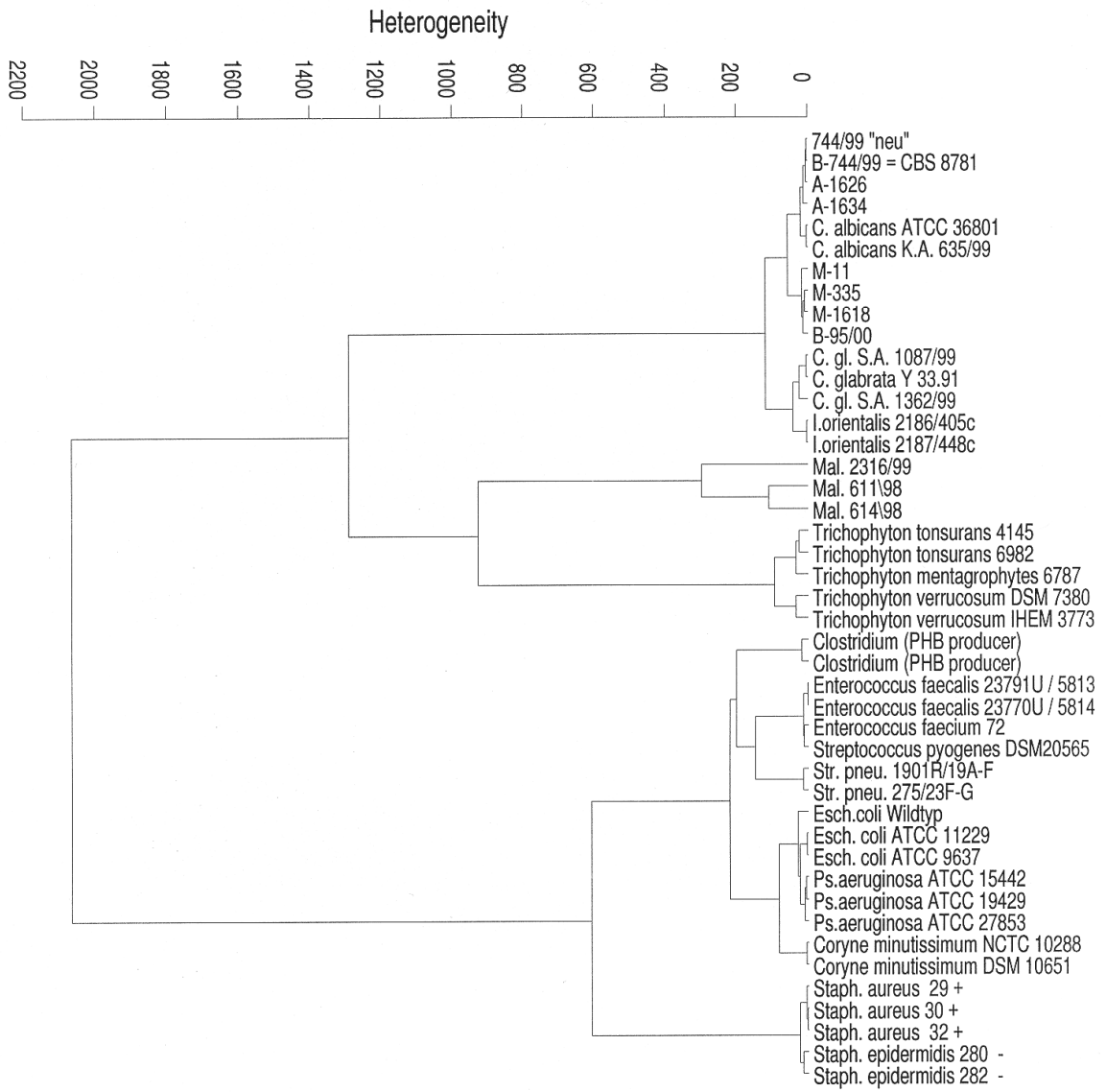
- ❖ *Candida albicans*
- ❖ *Candida glabrata*
- ❖ *Candida tropicalis*
- ❖ *Candida krusei* (*Issatchenkia orientalis*)
- ❖ *Candida parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*
- ❖ *C. lipolytica*, *C. pelliculosa*

- ❖ *C. zeylanoides*
- ❖ *Hansenula anomala* *Exophiala* spp.
- ❖ *Rhodotorula mucilaginosa*
- ❖ *Trichosporon beigeli*, *Pichia* spp., *Saccharomyces cerevisiae*
- ❖ *Zygosaccharomyces* spp.
- ❖ *Prototheca* spp.
- ❖ *Cryptococcus neoformans*
- ❖ *Malessezia* spp.
- ❖ *Trichophyllum* spp.
- ❖ *Microsporum canis*

Abbildung 1 zeigt ein Beispiel einer Clusteranalyse diverser Sprosspilze. Neben der Identifizierung und Differenzierung von Bakterien konnte auch die FT-IR Charakterisierung von Sprosspilzen und Dermatophyten für das mikrobiologische Routinelabor etabliert werden. Erste Versuche mit Schimmelpilzen zeigten ebenfalls ausgezeichnete Ergebnisse. Hier ist jedoch die Probenstandardisierung für die Spektroskopie wesentlich aufwendiger als für Bakterien und Hefen, kann jedoch analog dem für Dermatophyten praktizierten Verfahren angewandt werden.

Die FT-IR Spektroskopie erwies sich als ausgezeichnetes und vielseitiges Identifizierungs- und Differenzierungswerkzeug für die Routine, die den konventionellen Verfahren deutlich überlegen ist und sowohl für Bakterien und Pilze einsetzbar ist.

- ❖ Die FT-IR Spektroskopie ist schnell (ca. 2 min für eine Messung, 2 h für 15 Proben, ohne Vorkultur)
- ❖ Vollautomatische Spektrenaufnahme von 15 Proben
- ❖ Niedrige Kosten



Ward's Algorithm

Correlation with

Scaling to 1st range

Method File = CZAIIKA_D.CLA

Frequency Ranges (Weights) =

3600 - 3199 /cm (1.0)

901 - 699 /cm (1.0)

1200 - 900 /cm (1.0)

1500 - 1200 /cm (1.0)

1800 - 1499 /cm (1.0)

3001 - 2799 /cm (1.0)

3301 - 3000 /cm (1.0)

Differenzierung der wichtigsten fakultativ-pathogenen und apathogenen Sprosspilze

Evelin Ullrich & Pietro Nenoff

Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig & Hautklinik des Universitätsklinikums Leipzig AöR

Epidemiologie der Spross- oder Hefepilze

Die medizinisch relevanten Pilze gehören zu den sogenannten echten Pilzen (*Eumycota*) und vorrangig zu den Fungi imperfecti. In der klinischen Praxis werden Pilze entsprechend dem einfachen **D-H-S-System** nach Rieth eingeteilt. Nach diesem System unterscheidet man zwischen:

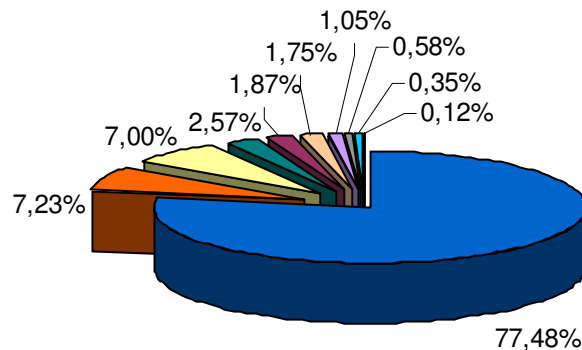
- D ... Dermatophyten
- H ... Hefen (Sprosspilze)
- S ... Schimmelpilzen und dimorphen Erregern (u. a. *Histoplasma capsulatum*)

Hefen pflanzen sich vegetativ durch Sprossung fort, dementsprechend bezeichnet man sie als Sprosspilze.

Im Jahr 1998 wurden an der Hautklinik der Universität Leipzig (Ambulanz und Stationen) insgesamt 1739 Pilze (Dermatophyten, Sprosspilze und Schimmelpilze) isoliert. Der Anteil der Sprosspilzisolat lag bei 68,1 % (1222), d. h., die Sprosspilze (= Hefen) spielen zahlenmäßig eine größere Rolle als z. B. Dermatophyten, deren Anteil nur 10,3 % (184) betrug. Auch wenn Sprosspilze nicht unbedingt krankheitsauslösend sind, sondern teilweise als Kontamination oder sekundäre Besiedler vorkommen, ist ihre Differenzierung wesentlicher Bestandteil der mykologischen Diagnostik im Pilzlabor einer Hautklinik, ebenso wie in einer dermatologischen Praxis.

Verteilung der Sprosspilze 1998 (n=1222)

<i>Candida</i> -Arten	77,5%
<i>Malassezia furfur</i>	7,2%
<i>Rhodotorula</i> species	7,0%
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2,6%
<i>Cryptococcus</i> species	1,9%
<i>Debaryomyces</i> species	1,8%
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1,1%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,6%
<i>Geotrichum candidum</i>	0,4%
<i>Trichosporon capitatum</i>	0,1%



Verteilung der Sprosspilze 1998

Sprosspilze als Erreger von Dermatomykosen

Sprosspilze oder Hefen können Mykosen der Haut, besonders intertriginöser Regionen, z. B. als Kandidose der Inguinalregion hervorrufen. Daneben werden gelegentlich auch Sprosspilze aus Nagelspanen bei einer Onychomykose isoliert, der eine Paronychie zuvor gehen kann. Man findet Sprosspilze, z. B. *Candida albicans*, aber auch andere *Candida*-Arten, als transiente Besiedler der Schleimhaut des Orointestinaltraktes des Menschen. Beim Vorliegen von Risikofaktoren kann eine Kandidose der Mundschleimhaut (Soor) oder des Gastrointestinaltraktes auftreten. Systemische oder Organmykosen bis hin zur *Candida*-Sepsis durch opportunistische *Candida*-Arten sind selten und betreffen ausschließlich stark immunsupprimierte Patienten.



Windeldermatitis



Onychomykose durch *Candida parapsilosis*



Soor der Zunge durch *Candida albicans*



Perleché („Faulecke“ oder Angulus infectiosus)

Material und Materialentnahme

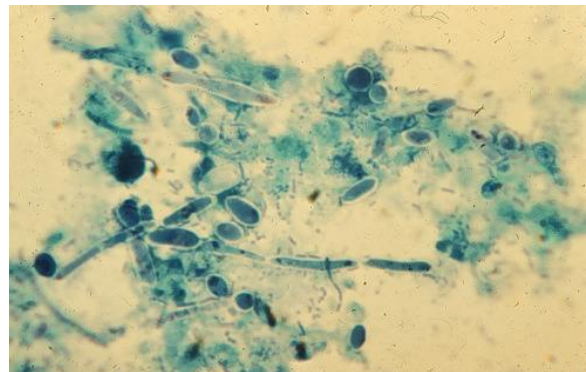
Von nässenden Läsionen sowie der Schleimhaut entnimmt man mit einem sterilen Wattetupfer Abstriche. Außerdem wird zur mykologischen Untersuchung von Sprosspilzen Urin, Stuhl, Sputum etc. verwendet.

Mikroskopische Beurteilung

Das Material wird auf Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet, hitzefixiert und angefärbt. Dazu dient die Gramfärbung - Pilze sind generell grampositiv- oder die einfachere und in der Praxis ausreichende Methylenblaufärbung .

Die mikroskopische Beurteilung erfolgt unter dem 100er Objektiv mittels Immersionsöl. Merkmale der Spross- oder Hefepilze sind:

- runde bis ovale Sprosszellen (= Blastosporen), die deutlich größer als Bakterien erscheinen
- Vermehrung durch Sprossung
- Mutterzelle - Knospung - Tochterzelle
- uni- oder multipolare Sprossung (bipolare Sprossung = *Kloeckera*)
- Pseudomyzel (= unechtes Myzel, das durch Streckung der Blastosporen entsteht)

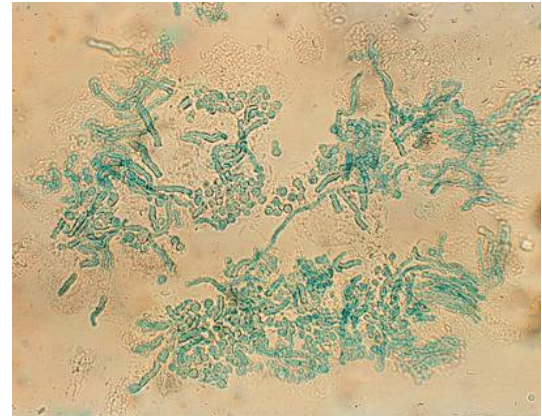


Es lassen sich folgende Aussagen anhand des mikroskopischen Präparates treffen:

- Sprosspilzzellen vorhanden/nicht vorhanden
- keine Gattungs- oder Artidentifizierung (gilt auch für KOH-Präparat!)
- Pilz (pseudo-)hyphen können prinzipiell auch von Dermatophyten oder Schimmeln stammen

Eine Ausnahme stellt *Malassezia furfur* dar (aber: KOH-Präparat). *Malassezia furfur* ist ein lipophiler Hefepilz und der Erreger der Pityriasis versicolor (= Kleinflechte). Er zeigt kein Wachstum auf konventionellen Nährböden. Bei Verdacht auf Pityriasis versicolor wird das Präparat wie folgt angefertigt:

- Tesafilm-Abriß: Klebestreifen fest auf Haut andrücken, dann auf Objektträger kleben
- 1 Tropfen 20%ige KOH unter Tesafilm: mikroskopische Beurteilung ist **sofort** möglich
- im KOH-Präparat sieht man Haufen von runden, sprosszellartigen Elementen gemeinsam mit kurzen gebogenen Hyphenstücken ("Bumerang"-artig)**



Pilzkultur = Anzucht der Erreger auf künstlichen Nährböden

Pilznährböden

Die Pilze benötigen zum Wachstum folgende Voraussetzungen:

- Kohlehydrat-Quelle = Glukose
- Stickstoff-Quelle = Pepton (Fleischextrakt)
- Wasser
- Vitamine
- Antibiotika (Penicillin, Streptomycin, Chloramphenicol oder Gentamicin)

Übliche Pilznährböden sind:

1. Sabouraud 2% oder 4%-Glukose-Nährboden für die Anzucht von Dermatophyten, Hefepilzen und Schimmelpilzen
2. Sabouraud-Glukose-Nährboden + Actidion® (= Cycloheximid) für die Anzucht von Dermatophyten und einigen Sprosspilzen

Falls ein Autoklav vorhanden ist, können Pilznährböden sehr einfach und kostengünstig selbst gegossen werden! Ansonsten stehen u. a. folgende **Fertignährböden** kommerziell zur Verfügung (z. B. von Heipha GmbH, Heidelberg):

1. Sabouraud-Glukose (2%)-Agar
mit Penicillin und Streptomycin
Petrischalen Art.-Nr. 351 b
2. Selektivagar für pathogene Pilze
enthält Chloramphenicol und Cycloheximid (Actidion®)
Petrischalen Art.-Nr. 139 b
3. Sabouraud-Glukose (2%)-Bouillon (2 ml)
Röhrchen Art.-Nr. 3521 r
4. Reis-Agar (Firma bioMérieux SA, Marcy/Etoile, France)
Petrischalen

Kulturelle Anzucht

Schuppen, Nagelspäne, Haare, Tupfer, etc. werden direkt aufgebracht (mit der Impföse etwas in den Nährboden eindrücken) bzw. auf feste Nährböden ausgestrichen. Oder man fertigt eine **Sekundär- bzw. Anreicherungskultur** an, insbesondere falls Sprosspilze nachgewiesen werden sollen. Für die Anreicherungskultur = Sekundärkultur (= Versetzen mit flüssigem Sabouraud-Nährmedium) verwendet man beispielsweise folgendes kommerzielles System:

- a) Fungi-Quick® für Abstriche (Hain DIAGNOSTIKA GmbH, Nehren) oder
- b) flüssiges Sabouraud-Medium (3-5 ml) zur Probe (Abstrichröhren, Urin, Stuhl, Sputum usw.) geben und bei 37°C über Nacht inkubieren, danach Ausstreichen auf feste Nährböden (Sabouraud 4%-Glukose-Agar, evtl. extra Sabouraud-Agar + Actidion®)

Inkubationszeit

Material	Bebrütungszeit	Temperatur
Schuppen, Nagelspäne Haare (Haarwurzeln)	4 Wochen	Raumtemperatur
Schleimhaut-Abstriche, Urin, Sputum, Stuhl	6 Tage	37°C
Hautabstriche	6 Tage bis 4 Wochen (Dermatophyten!)	Raumtemperatur

Außerdem besteht die Möglichkeit, sowohl eine Primär-, als auch die Sekundärkultur anzulegen. Es ist sinnvoll, das Präparat erst nach der Über-Nacht-Anreicherung anzufertigen und auf Objektträger auszustreichen, d. h. nachdem die Kulturen beimpft wurden, da sonst die Kultur unsteril wird.

Grundbegriffe der Pilzdifferenzierung

Morphologie der Pilze

Makromorphologie

Oberfläche des Thallus (= Fruchtkörper, = Pilzkolonie)

- Luftmyzel (Dermatophyten, Schimmel)
- glatt (Sprosspilze)
- Farbe

Kultur-Unterseite:

- glatt (Dermatophyten, Sprosspilze)
- gefurcht (Schimmel)
- Färbung (Pigment)

Mikromorphologie

1. Pilzfaden = Hyphe

Pilzgeflecht = Myzel

- septiert/unseptiert
- echtes Myzel (Dermatophyten, Schimmel)
- unechtes Myzel = Pseudomyzel (Sprosspilze)

2. Sprosszellen = Hefezellen = Blastosporen

3. Sporen = Fortpflanzungsformen (Dermatophyten, Schimmel)

= Konidien

a) Makrokonidien

- Kammerung
- Form

b) Mikrokonidien

- Anordnung

Makroskopische Merkmale der Sprosspilze

- Farbe: weiß bis beige, manchmal grau
- glatte, leicht gewölbte, erhabene Kolonien bis zum Durchmesser von 5 mm
- evtl. pseudomyzeliale Elemente, die in den Nährboden einwachsen (= submerses Wachstum der Sprosspilze, im Gegensatz zum vegetativen Luftmyzel der Dermatophyten und Schimmelpilze)
- Kulturoberseite: gelegentlich rauh (gefaltet, gefurcht)

Anhand der mit dem bloßen Auge sichtbaren Merkmale ist keine Differenzierung möglich!

Ausnahmen sind:

Candida parapsilosis: Rauform: faltige, rauhe Oberfläche (Kein Luftmyzel!), cave: glatte Formen von *Candida parapsilosis*

Trichosporon spp.: stark gefaltete Oberfläche, zähe Kolonien, die schwer mit der Impföse zu entnehmen sind

Rhodotorula spp.: rote Sprosspilze = apathogen

Mikroskopische Differenzierung von Sprosspilzen

Wenn man auf Sabouraud-Agar gewachsene Sprosspilzkolonien unter dem Mikroskop betrachtet, sieht man nur Sprosszellen, evtl. ist Pseudomyzel sichtbar, aber eine Gattungs- oder Artidentifizierung ist nicht möglich.

Zu einer exakten Differenzierung ist die Herstellung einer Subkultur auf Reisnährboden notwendig. Dazu wird von den vorliegenden Hefekolonien mit einer Impföse Material entnommen und mit 3 Impfstrichen auf den Reis-Agar aufgebracht. Reis-Agar ist ein Mangelmedium, das wenig Nährstoffe und wenig Sauerstoff enthält. Auf die Reis-Agar-Platte kommt sofort ein Deckgläschen. Bebrütet wird 48 h bei Raumtemperatur.

Anschließend Beurteilung mit dem 10er bzw. 40er Objektiv.

- ovale bzw. runde Sprosszellen haben sich gestreckt
- Ausbildung von Pseudomyzel
- einige Sprosspilzarten bilden artspezifische Strukturen aus Pseudomyzel und Sprosszellen

Stoffwechselleistungen der Sprosspilze

Empfindlichkeit gegenüber Cycloheximid

Cycloheximid (=Actidion®, aus *Streptomyces noursei* isoliert) ist ein Hemmstoff des Wachstums von Schimmelpilzen und auch einiger Sprosspilze. Im Nährboden sind 400 µg Cycloheximid/ml enthalten.

a) Actidion-empfindlich = kein Wachstum auf Actidion-Nährböden

Candida parapsilosis

Candida glabrata

Candida krusei

Saccharomyces cerevisiae

Cryptococcus neoformans et *Cryptococcus* species

b) Actidion-resistent, d. h. diese Sprosspilzarten wachsen auf Actidion-Nährboden

Candida albicans

Candida kefyr

Trichosporon cutaneum

c) Actidion-Empfindlichkeit variabel:

Candida guilliermondii

Candida tropicalis

Biochemische Differenzierung von Sprosspilzen

Die biochemische Differenzierung umfasst die Beurteilung von Assimilation (Verwertung) und Fermentation (Spaltung) von Kohlehydrat-Quellen (Glukose, Galaktose, Saccharose, D-Xylose, Inosit u. a.) sowie von Stickstoff-Quellen (Pepton, KNO₃) Früher verwendete man zur Untersuchung der biochemischen Eigenschaften Testblättchen. Heute nutzt man kommerziell verfügbare "bunte Reihen" (Bsp.: Mycotube Roche (Hofmann La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), ID 32 C (bioMérieux SA, Marcy/Etoile, France) oder Auxacolor (Sanofi/Pasteur, Berlin, Deutschland).

Prinzip der Durchführung der "bunten" Reihe:

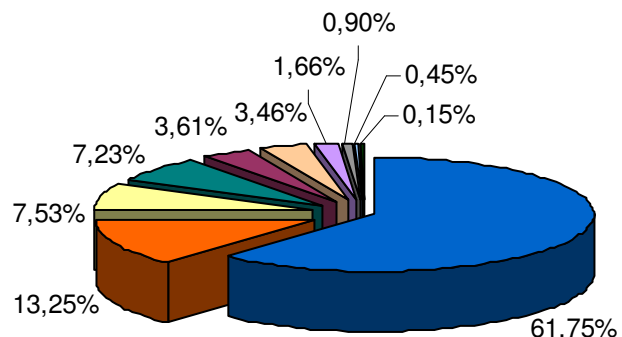
- Sprosspilzsuspension in Vertiefungen pipettieren (darin sind Substrate, z. B. Kohlehydrate)
- 24 - 48 h Inkubation
- Wachstumsbeurteilung (Färbung bzw. Trübung)
- Zahlen-Code (8-stellig) aufstellen = Index
- Auswertung: Ablesen der Sprosspilzart in Tabelle, Buch oder Software

Sprosspilzarten

Candida-spp.

Die Gattung *Candida* umfasst etwa 190 Arten, von denen jedoch nur etwa 10 bis 20 tatsächlich in der täglichen Praxis gefunden werden. Der Anteil der *Candida*-Arten an den insgesamt 1998 an der Hautklinik der Universität Leipzig isolierten 1222 Sprosspilzen betrug 77,48%, mit folgender Verteilung (Abb. 8):

<i>Candida albicans</i>	61,8%
<i>Candida parapsilosis</i>	13,3%
<i>Candida guilliermondii</i>	7,5%
<i>Candida glabrata</i>	7,2%
<i>Candida tropicalis</i>	3,6%
<i>Candida krusei</i>	3,5%
<i>Candida species</i>	1,7%
(Ø Artdifferenzierung)	
<i>Candida kefyr</i>	0,9%
<i>Candida lipolytica</i>	0,5%
<i>Candida famata</i>	0,2%



prozentuale Verteilung der *Candida*-Arten

Candida albicans

Candida albicans war im gesamten Jahr, mit 61,75%, die am häufigsten isolierte *Candida*-Art.

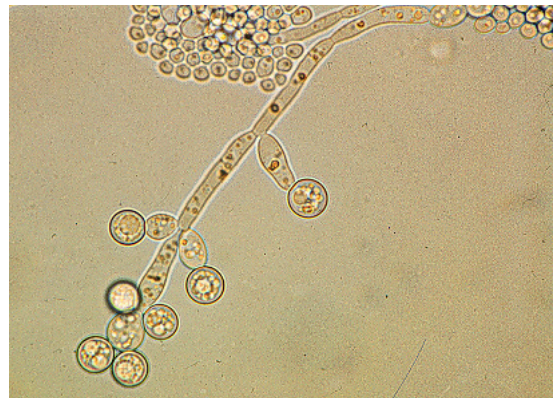
Albicans ID-Nährboden (bioMérieux SA, Marcy/Etoile, France)

Von einer auf Sabouraud-Glucose-Agar primär oder sekundär isolierten Hefekolonie wird Material auf den sogenannten Albicans ID-Agar überimpft. Nach 4 h Bebrütung bei 37°C zeigt ausschließlich die Art *Candida albicans* eine Blaufärbung. Diese Farb-reaktion ist sehr spezifisch, so dass auf weitere oben genannte Differenzierungsmöglichkeiten verzichtet werden kann. *Candida albicans* weist meist glatte, beige erscheinende, gewölbte Kolonien auf.



Mikroskopie auf Reis-Agar

- Pseudomyzel
- Sprosszellen
- Chlamydosporen (= Mantelsporen)
= asexuelle, lipidreiche, dickwandige, terminal angeordnete Sporen (Dauerformen, ähnlich wie bei Bakterien), gelten als artspezifisch für *Candida albicans*

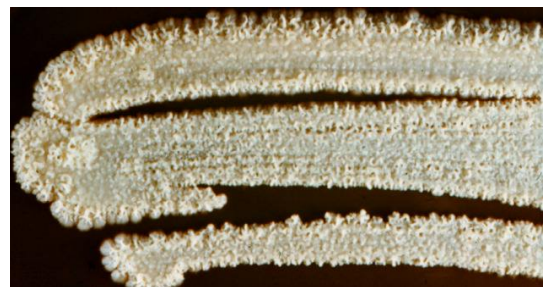


Hinweis: 1996 ist eine neue *Candida*-Art beschrieben worden: *Candida dubliniensis*. Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch (reichlich endständige Chlamydosporen) ist diese neue Spezies nicht von *Candida albicans* zu unterscheiden. Entscheidendes Kriterium für *Candida albicans* ist das Wachstum bei 45° C, was für *Candida dubliniensis*-Stämme nicht möglich ist (s.o.).

Candida parapsilosis

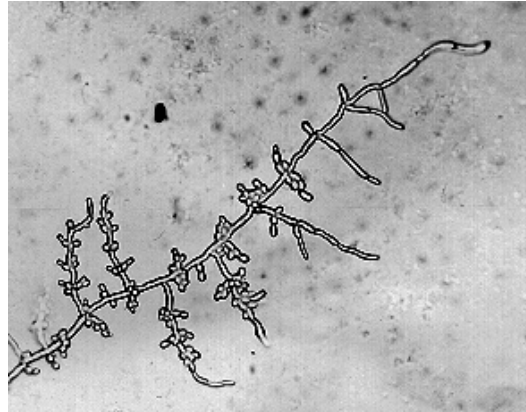
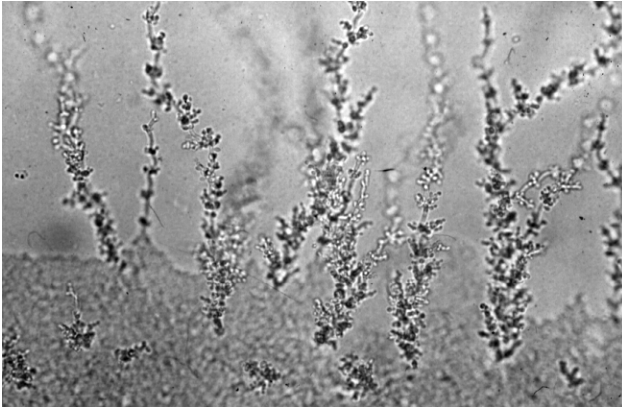
Makroskopie

Bei *Candida parapsilosis* sind makroskopisch rauhe, faltige Kolonien erkennbar. Es gibt darüber hinaus auch Stämme mit glatter Oberfläche.



Mikroskopie auf Reis-Agar

Mikroskopisch sind einzelne, mittelgroße, teils längliche Sprosszellen links und rechts am wenig verzweigten, relativ kurzen Pseudomyzel.



Candida tropicalis

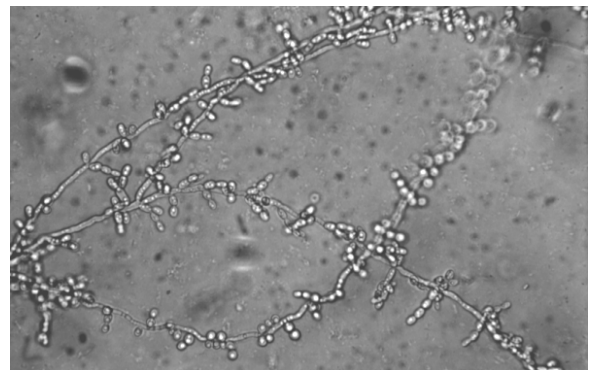
Makroskopie



Candida tropicalis auf Sabouraud-Glukose-Agar

Mikroskopie auf Reis-Agar

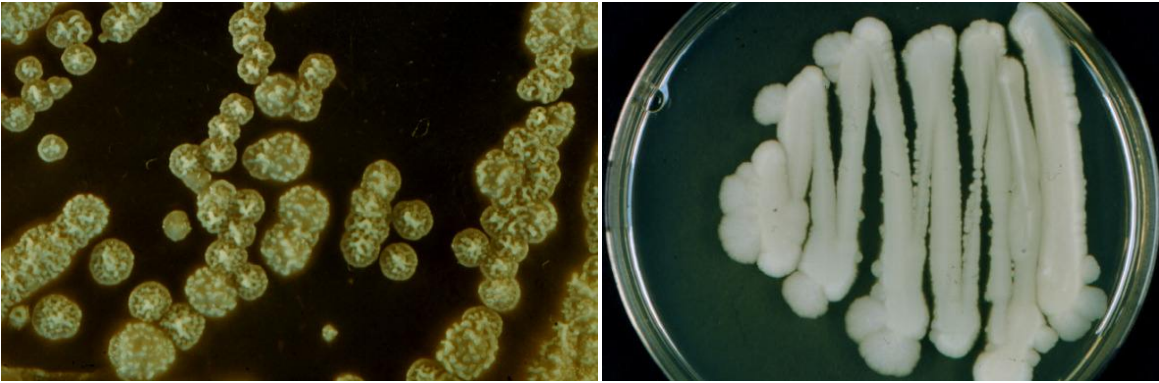
Candida tropicalis bildet auf Reis-Agar stark verzweigtes, auffällig langes Pseudomyzel mit vielen, mittelgroßen Sprosszellen an den Verzweigungen.



Candida krusei

Makroskopie

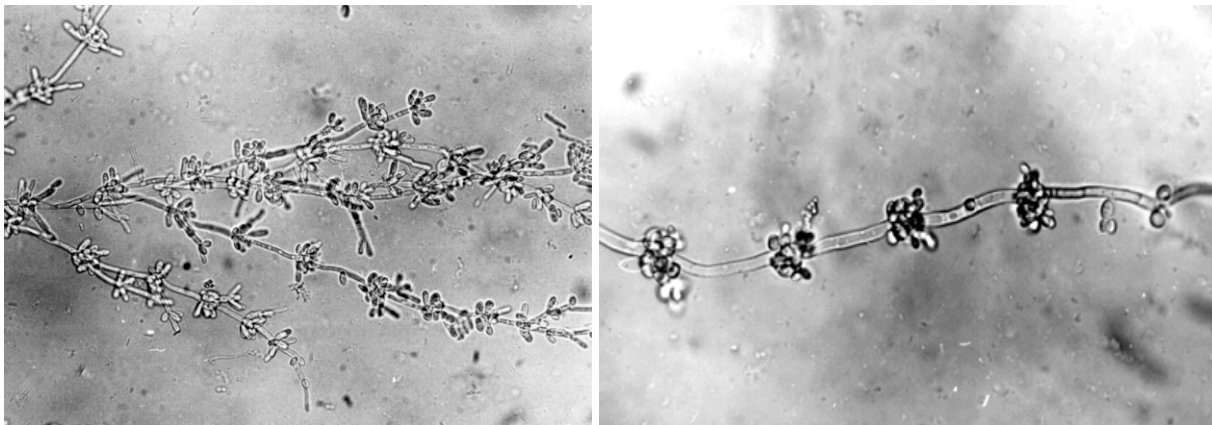
Candida krusei zeigt matte, ausstrahlende, manchmal rauh, eventuell gefaltete Kolonien mit Pseudomyzelbildung bereits auf Sabouraud-Glukose-Agar .



Candida krusei auf Sabouraud-Glukose-Agar

Mikroskopie auf Reis-Agar

Auf Reis-Agar sind sehr große, längliche, manchmal balkenförmige Zellen und Pseudomyzel erkennbar.



Candida glabrata

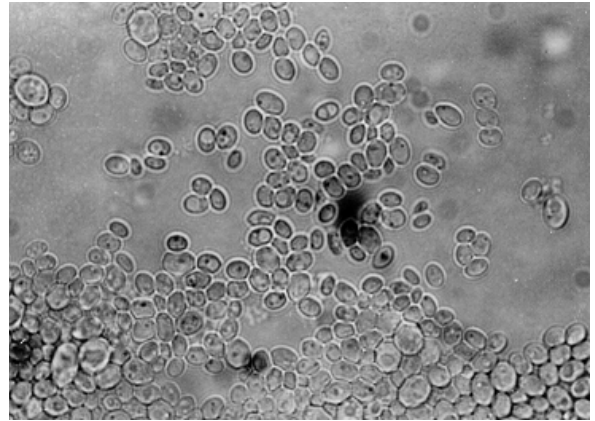
Makroskopie

Candida glabrata zeichnet sich durch Kolonien mit zentraler Erhebung aus.



Mikroskopie auf Reis-Agar

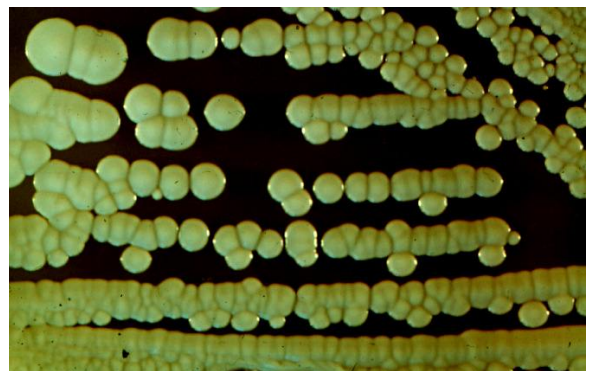
Candida glabrata bildet kein Pseudomyzel. Die meist sehr kleinen und runden oder ovalen Sprosszellen liegen als kleine Haufen zusammen.



Candida guilliermondii

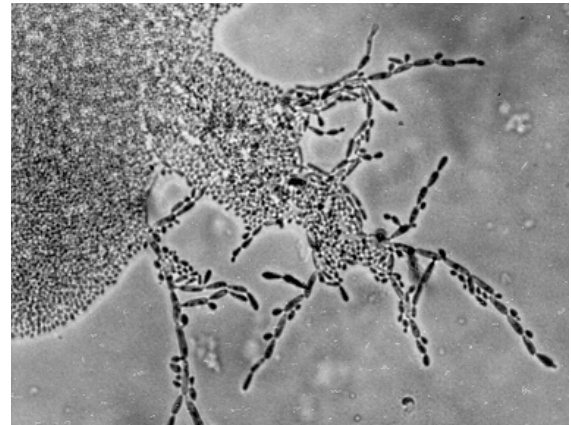
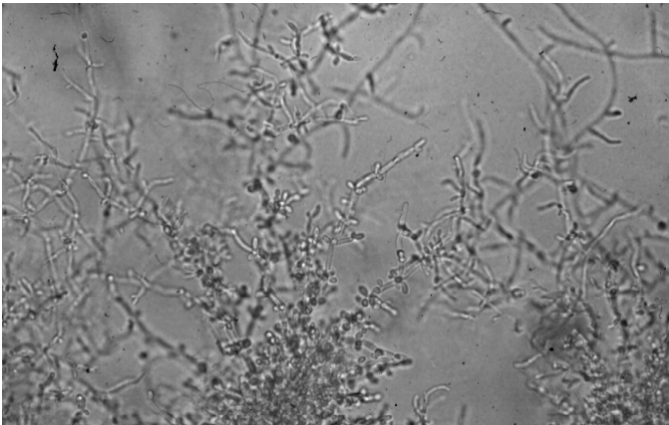
Makroskopie

Candida guilliermondii auf Sabouraud-Glukose-Agar



Mikroskopie auf Reis-Agar

Kleine, oft längliche Sprosszellen wachsen gemeinsam mit kurzem, verzweigten Pseudomyzel, welches aus den Haufen der Blastosporen sprießt.

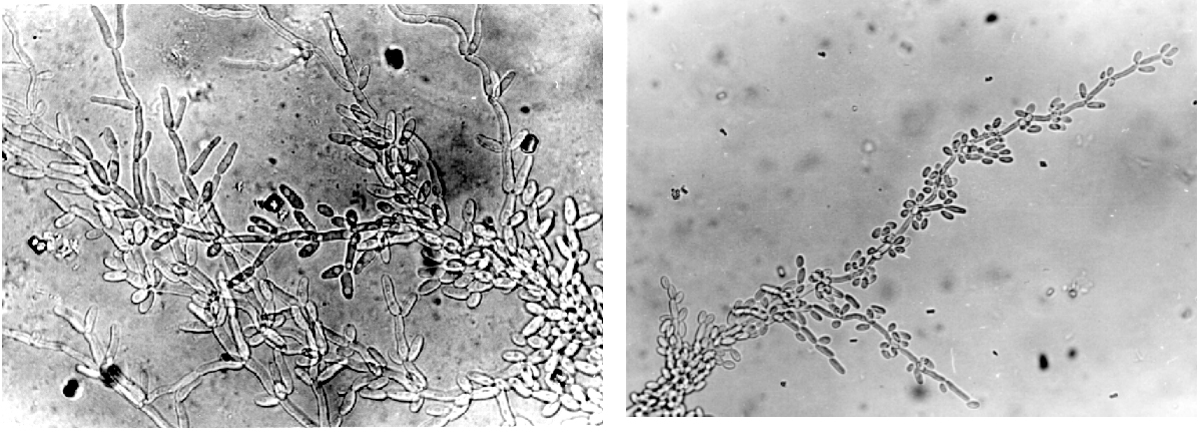


Candida kefyr (früher: *pseudotropicalis*)

Candida kefyr ist in Milchprodukten enthalten. Ob diese Spezies als pathogen anzusehen ist, ist noch fraglich. Es gibt jedoch einzelne Mitteilungen über systemische Kandidosen etc., verursacht durch *Candida kefyr*.

Mikroskopie auf Reis-Agar

Längliche Sprosszellen von *Candida kefyr*, etwas kleiner als die von *Candida krusei*, die oft parallel am Pseudomyzel angeordnet liegen.



Candida lusitaniae

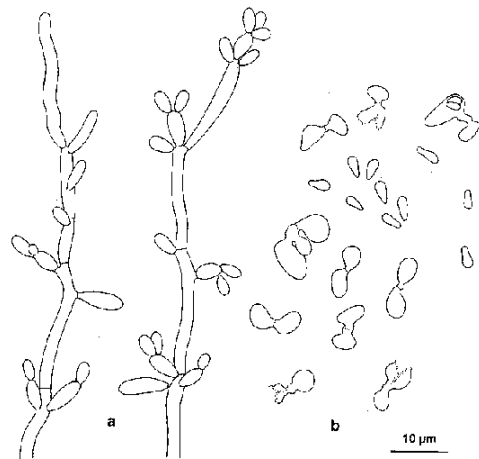
Die Hefe ist Erreger systemischer Mykosen in der inneren Medizin (Hämatologie/Onkologie) bei immunsupprimierten Patienten. Daneben kann man sie auch als sekundären Besiedler oder Kontamination aus Hautmaterialien anzüchten. Von Bedeutung ist, dass sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* (?) eine Resistenz gegenüber Amphotericin B bestehen kann, so dass eine Empfindlichkeitstestung in jedem Fall angezeigt ist.

Makroskopie

Makroskopisch ist *Candida lusitaniae* durch beige, cremefarbene Kolonien gekennzeichnet.

Mikroskopie auf Reis-Agar

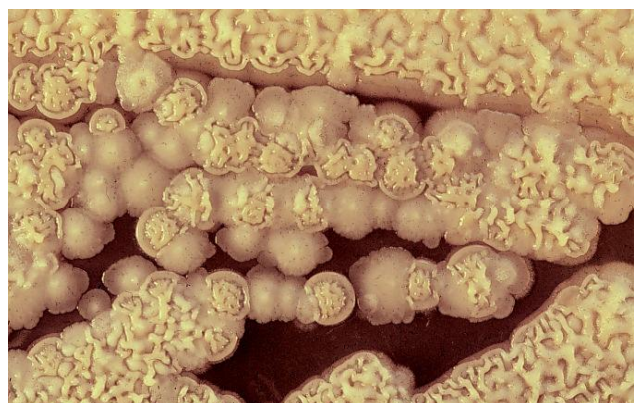
Nur gelegentlich entwickeltes Pseudomyzel mit Ketten von kleinen, ovalen Blastosporen auf Reis-Nährboden. Die Pseudomyzelbildung kann verzögert auftreten. Häufig bilden sich nur einzelne Pseudomyzelstränge aus, die in unterschiedlich weiten Abständen von einer Kolonie ausgehen. Manchmal sind die Kolonien auch sehr dicht von Pseudomyzel umgeben. Insgesamt entsteht ein Gesamteindruck, der dem mikro-morphologischen Bild von *Candida guilliermondii* sehr ähnelt! (Abbildung aus De Hoog & Guarro, 1995)



Candida lipolytica

Makroskopie

Candida lipolytica ist ein Hefepilz, der auf flüssigen, jedoch meist auch auf festen Nährböden eine stark gefaltete, feste, zähe Haut ausbildet. Anfangs sieht man flache, später mehr oder weniger erhabene Kolonien, die mit zunehmendem Alter einen



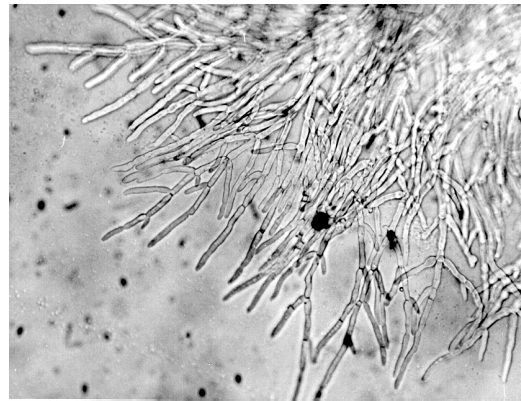
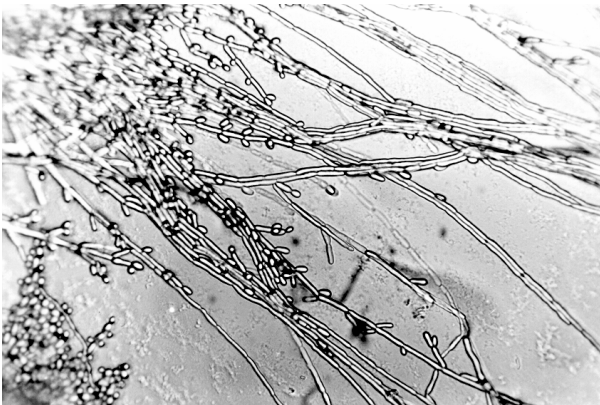
gelappten Rand sowie eine trockene Kulturoberseite aufweisen können.



Candida lipolytica: Fettspaltung/Lipolyse

Mikroskopie Reis-Agar

Lange Pseudohyphen und strahlenförmig auslaufendes, bäumchenartiges Pseudomyzel, außerdem Blastosporen, die einfach oder gepaart sind, nodal (an den Septierungen) oder internodal an den Hyphen inserieren .



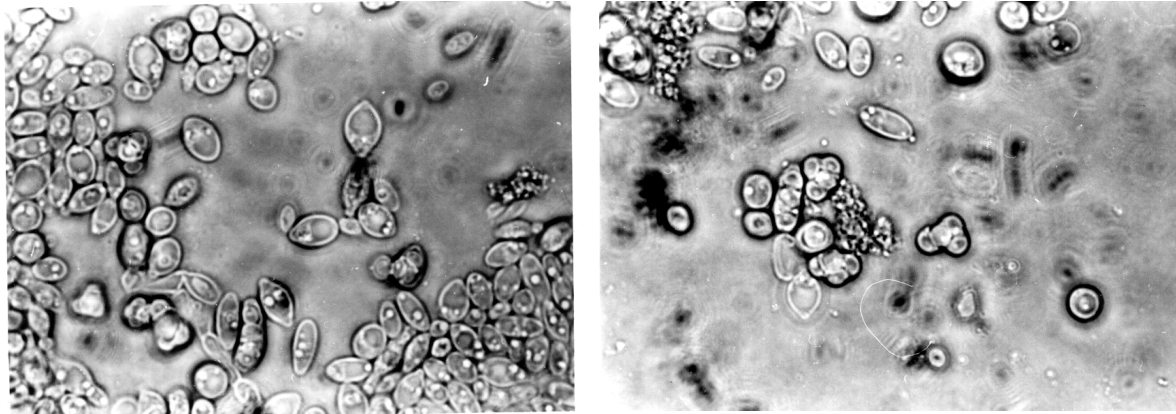
Candida lambica (Pichia fermentans)

Makroskopie

Cremerfarbene, glatte, wenig erhabene Kolonien.

Mikroskopie auf Reis-Agar

Candida lambica (*Pichia fermentans*) bildet nicht immer Pseudomyzelbildung auf Reis-Agar. Wenn, dann lagern sich die länglichen Zellen zu verzweigten Ketten zusammen.



Candida norvegensis

Seltene Ursache von mukokutanen Kandidosen, einmal bisher als Erreger einer systemischen Mykosen erwähnt.

Makroskopie

Flache, runde, grau-weißliche bis cremefarbene Kolonien, die am Rand gelappt sein können, gelegentlich bereits mit Pseudomyzel auf Sabouraud-Glukose-Agar.

Mikroskopie auf Reis-Agar

Ein einfach verzweigtes Pseudomyzel, welches insgesamt untypisch im Vergleich zu dem Pseudomyzelmuster der meisten anderen *Candida*-Arten ist. Pseudomyzel kann fehlen!

Candida pelliculosa

Fungämien und Organmykosen bei immunkompetenten und vor allem immunsupprimierten Patienten (auch AIDS-Patienten, Frühgeborene) wurden mehrfach beschrieben, oft in Form der katheter-assoziierten Sepsis.



Makroskopie

Schnell wachsende, kräftige Kolonien, die konvex sind und cremefarben bis weißlich erscheinen. Peripher manchmal Lappung der Kolonien sowie Beginn einer Pseudomyzelbildung.

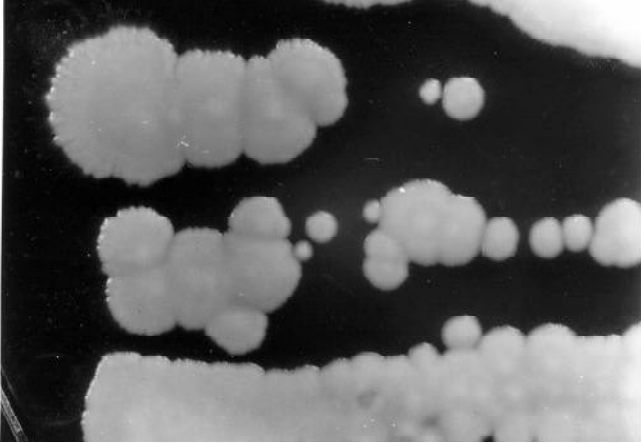
Mikroskopie auf Reis-Agar

Primitives Pseudomyzel büschel- oder traubenförmig. Kolonien ganz oder teilweise von Pseudomyzel umgeben. Gelegentlich Ausbildung von Ascosporen.

Candida valida (*Pichia membranaefaciens*)

Diese *Candida*-Art wird u. a. aus fermentierten Erzeugnissen, z. B. Wein, Bier, Obstsaft, Yoghurt, seltener aus Stuhl isoliert.

Selten systemische Mykosen bei Patienten mit immunsupprimierenden Faktoren.



Makroskopie

Kolonien sind weiß bis beige, glatt oder leicht faltig mit unregelmäßigem Rand, der von Pseudomyzel umgeben sein kann.

Mikroskopie auf Reis-Agar

Pseudomyzel aus Ketten zylindrischer Zellen, die lang und leicht gebogen sind. Zusammen mit den Blastosporen entsteht der Eindruck von „Federn“.

Candida rugosa

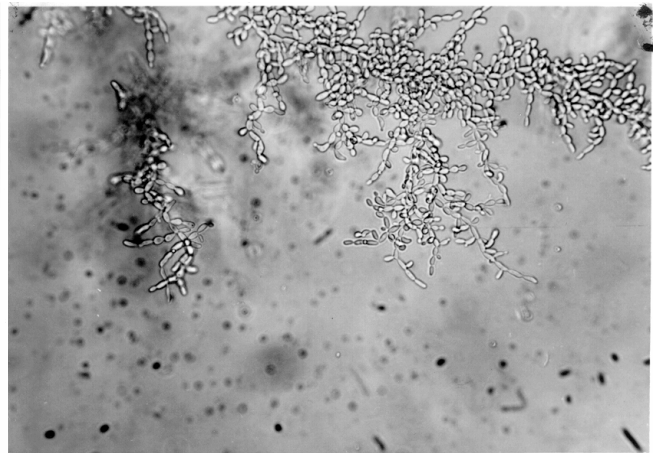
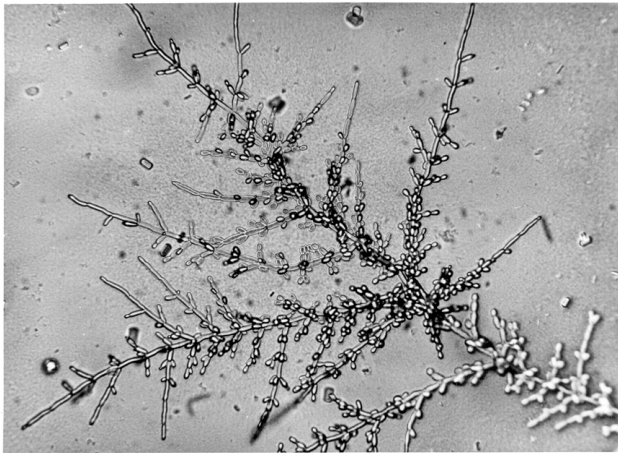
Selten Isolierung aus dem Stuhl von Mensch und Tier. Sonst aus Milchprodukten und Obstsäften bekannt. Fakultativ-pathogener Sprosspilz.

Makroskopie

Glatte oder faltige Kolonien, Farbe schmutzig weiß bis gelb-grau.

Mikroskopie auf Reis-Agar

Kurzes, stark verzweigtes Pseudomyzel; keine Blastosporen.



Candida pintolopesii* var. *slooffii

Isolat aus der Niere einer Maus



Makroskopie

Der Stamm wurde freundlicherweise von Frau Dr. Keller, Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. *Candida (Torulopsis) pintolopesii* spielt in der Veterinärmedizin eine Rolle und wurde bereits von verschiedenen Tierarten isoliert. Darunter zu nennen sind neben der oben erwähnten Maus noch Schwein, Pferd, Ratte, Meerschweinchen, Hamster, Möwen und Pavian.

Mikroskopie auf Reis-Agar

Auf Reisagar bildet sich, im Gegensatz zu *Candida glabrata* innerhalb kurzer Zeit ein Pseudomyzel aus.

Trichosporon cutaneum (beigelii)

Trichosporon cutaneum ist Erreger der “weißen Piedra”, die gekennzeichnet ist durch steinharte, weiße Anlagerungen an den Haaren, oft der Achsel- oder Schambehaarung. Es sind aber auch Haut- und Schleimhautbesiedlung und -infektionen möglich. Falls Symptome bestehen, ist diese Erkrankung behandlungsbedürftig.

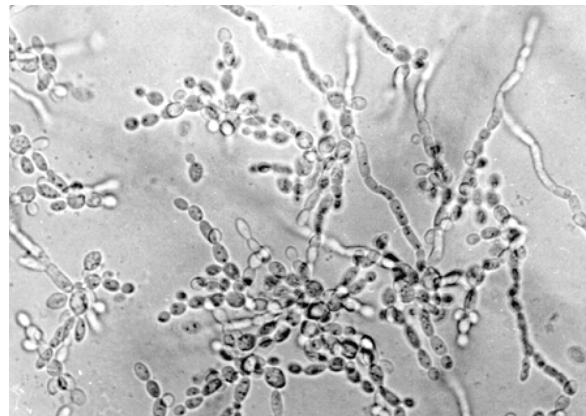
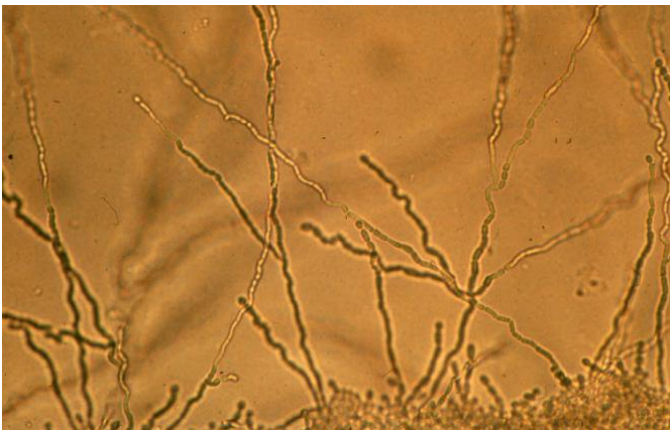
Makroskopie

Trichosporon cutaneum bildet auf Sabouraud-Glukose-Agar gefaltete, zähe Kolonien.



Mikroskopie auf Reis-Agar

Pseudomyzel, Sprosszellen und Arthrosporen sind erkennbar. Arthrosporen (Gliederstücke) entstehen durch Teilung einer Hyphe. Sie sind oft zick-zack-artig angeordnet.

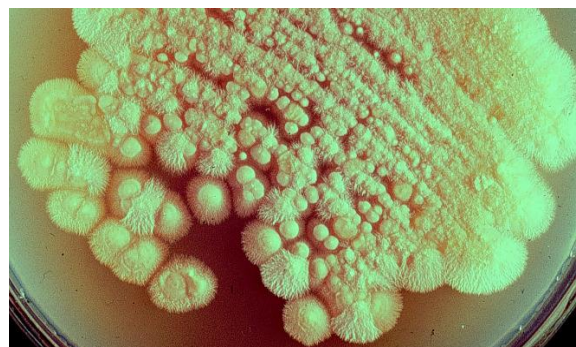


Trichosporon (Geotrichum) capitatum

synonyme Bezeichnung: *Blastoschizomyces capitatus*

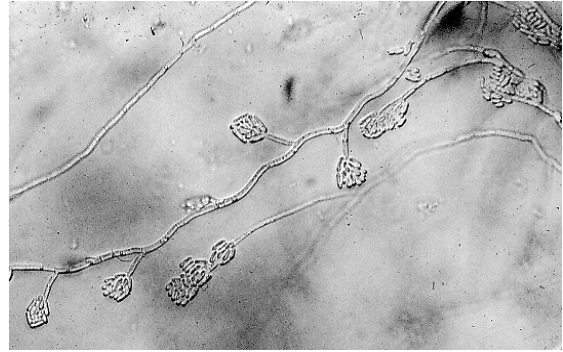
Makroskopie siehe *Trichosporon cutaneum*

Trichosporon capitatum auf Sabouraud-Glukose-Agar.



Mikroskopie auf Reis-Agar

Auf Reis-Agar sind Haufen von Sprosszellen, aus denen langes Pseudomyzel mit typischen Arthrosporen herauswächst, erkennbar. Die Bezeichnung *Trichosporon capitatum* leitet sich von der charakteristischen "Köpfchen"-artigen Anordnung von länglich geformten Sprosszellen am Pseudomyzel ab .



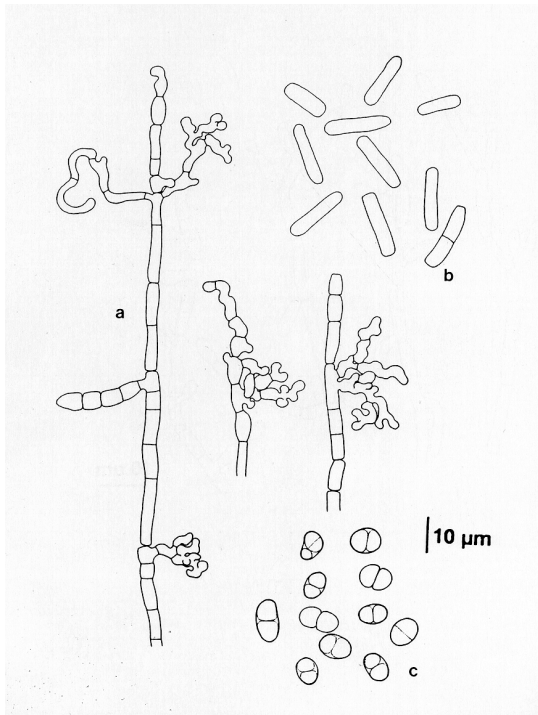
Trichosporon inkin

Seltener isolierte *Trichosporon*-Art. Hier handelt es sich um einen Stamm, der aus Hautschuppen einer Läsion eines 16-jährigen Jungen mit Verdacht auf eine Mykose der Leistengegend (Rötung, Schuppung, Erosionen) angezüchtet wurde (Labornummer 1338/98).

Klinisch als Ursache der weißen Piedra der Haare im Genital- oder Achselhöhlenbereich beschrieben, außerdem selten als Erreger von systemischen, disseminierten Mykosen bei immunsupprimierten Patienten.

Makroskopie

Zerebriforme, stark gefaltete, raue Oberfläche der Kolonien, ähnlich der Struktur der anderen *Trichosporon*-Arten.



Mikroskopie auf Reis-Agar

Sprosszellen und laterale Konidien fehlen. Arthrokonidien oder -sporen als entscheidendes Charakteristikum für *Trichosporon* sind vorhanden und erscheinen lang und zylindrisch.

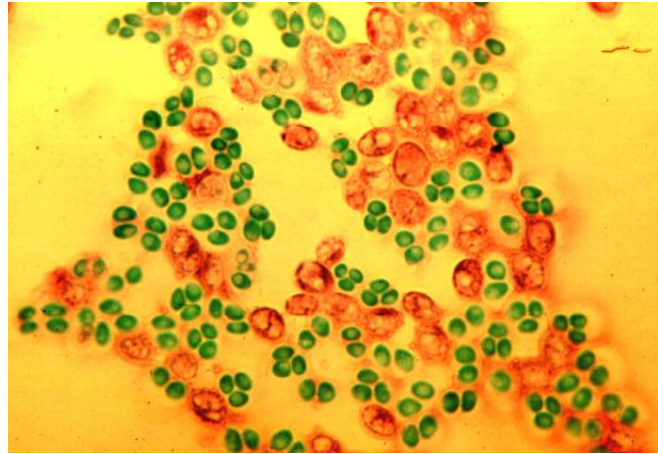
Sarcinen sind gelegentlich vorhanden auf zuckerreichen Medien. Daneben fallen vor allem Hyphen mit sog. Appressorien (engl. appressoria) auf, d. h. die Hyphen sind geweihartig gefaltet und gebogen, ein Eindruck, der bei den anderen *Trichosporon*-Spezies fehlt.

(Abbildung aus De Hoog & Guarro, 1995)

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae wird als Bäcker- und auch Bierhefe (gleiche Hefeart, aber verschiedene Stämme geben den verschiedenen Biersorten die Würze) bezeichnet. Diese Spezies zählt zu den apathogenen Pilzen und wird gelegentlich aus Stuhl, aber auch Rachen- und sogar Vaginalabstrichen isoliert.

Saccharomyces cerevisiae - Malachitgrün-Safranin-Färbung



Mikroskopie auf Reis-Agar

Saccharomyces cerevisiae bildet neben asexuellen einzelligen Blastosporen auch sexuelle Sporen, jedoch kein Pseudomyzel aus. Manchmal bilden sich aus den Sprosszellen relativ kurze, plumpe eher nur angedeutete Hyphenstücke. Ascosporen sind eine charakteristische morphologische Struktur dieser apathogenen Hefe. Das sind Sporen, die in einem Ascus (Beutel) liegen.



Debaryomyces

Pilze der Gattung *Debaryomyces* vermehren sich sexuell. Die imperfekte Form entspricht *Candida famata*. Sie sind humanmedizinisch von geringer Bedeutung. Gelegentlich isoliert man die Hefe von Nahrungsmitteln.

Makroskopie

Makroskopisch sind glatte beige Kolonien ohne Pseudomyzel auf Sabouraud-Glukose-Agar erkennbar.

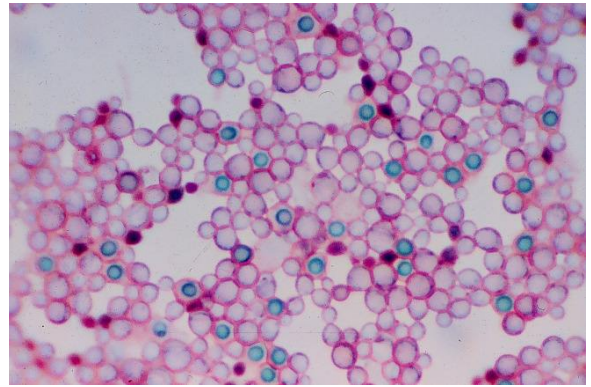
Debaryomyces dekkeri auf Sabouraud-Glukose-Agar



Mikroskopie auf Reis-Agar

Ausschließlich Blastosporen, die verschieden groß erscheinen, z. T. ähnlich wie bei *Saccharomyces* auch Ascosporen bilden, und überhaupt kein Pseudomyzel sind Erkennungszeichen auf Reis-Agar.

Debaryomyces nicotianae bildet Ascosporen, Malachit-Grün-Färbung



Cryptococcus neoformans (Filobasidiella neoformans)

Cryptococcus neoformans ist die einzige pathogene Art innerhalb der Gattung *Cryptococcus*. Die Hefe gehört nicht zur normalen Mikroflora des Menschen, jeder Nachweis ist ein kontrollbedürftiger Befund mit therapeutischen Konsequenzen. Saprophytäre *Cryptococcus*-Arten, die von Haut und Nägeln isoliert werden, können als Art *Cryptococcus species* (Gattung *Cryptococcus*, ohne Art-differenzierung) angegeben werden und sind apathogen.

Makroskopie

Die Kolonien von *Cryptococcus neoformans* sind beige bis ockerfarbig oder cremefarbig, konvex, glänzend, schleimig, gelegentlich auch weniger schleimig.

Cryptococcus neoformans auf Sabouraud-Glukose-Agar



Sie haben einen Braunfärbefekt auf Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar nach STAIB.

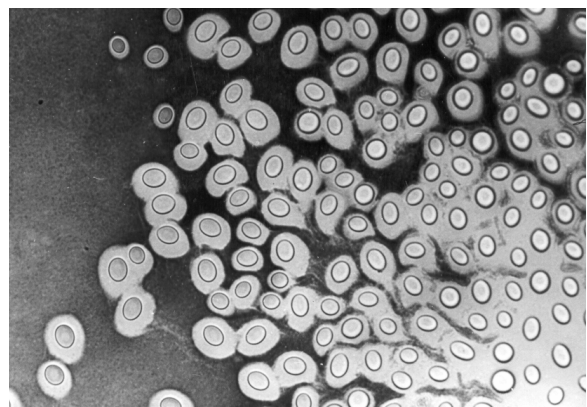
Cryptococcus neoformans Unterschied zwischen *Cryptococcus species* (weiß) und *Cryptococcus neoformans* (braun) auf Staib-Agar



Mikroskopie auf Reis-Agar

Die Sprosszellen-Abstände sind (wegen der nicht sichtbaren Schleimkapseln) auffällig groß. *Cryptococcus neoformans* bildet kein Pseudomyzel aus. Eine spezielle Darstellung von *Cryptococcus neoformans* ist im BURRI-Präparat (Tusche) möglich. Die Schleimkapsel zeichnet sich als Hof um die kleinen Sprosszellen deutlich ab. Letzteres Präparat wird zur Liquordiagnostik bei Verdacht auf zentralnervöse Kryptokokkose eingesetzt.

Cryptococcus neoformans im Tusche-Präparat nach BURRI.



Rhodotorula



Rhodotorula mucilaginosa Urinkultur

Es handelt sich um eine apathogene Hefe, eine sog. „rote Hefe“. In der Dermatologie findet man den Pilz relativ häufig z. B. als Kontamination in Nagelmaterial, Hautschuppen oder in Abstrichen von der Haut, ohne dass dem eine klinische Bedeutung zukommt.

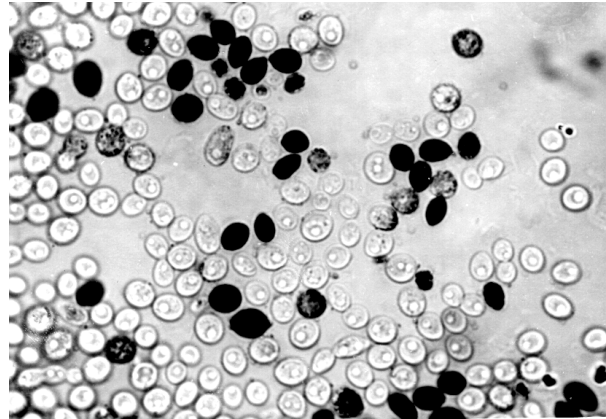
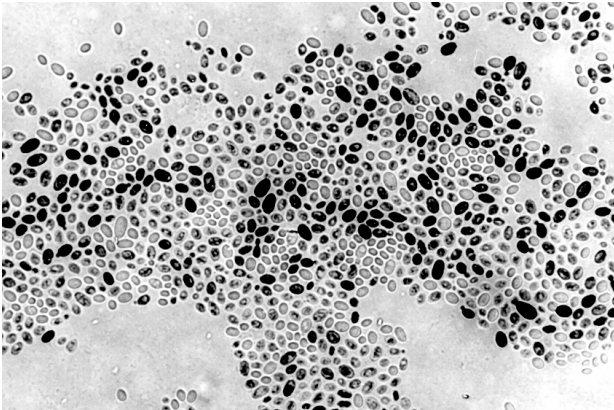
Makroskopie

Leicht erkennbar ist dieser Sprosspilz an der roten Pigmentierung der Kolonien, so dass eine „Blickdiagnostik“ möglich ist. Eine Differenzierung bis zur Spezies-, also Artebene ist nicht notwendig. Erwähnt

werden soll nur, dass u. a. neben *Rhodotorula rubra* oder *glutinis* auch *Rhodotorula mucilaginosa* (auffällig schleimige Kolonien) unterschieden wird .

Mikroskopie auf Reis-Agar

Ellipsoide sprossende Zellen mit z. T. großen Abständen zwischen den Zellen auf Reis-Agar erkennbar (da es sich um *Rhodotorula mucilaginosa* handelt).



Geotrichum candidum

Geotrichum candidum („Milchsimmel“ = Trivialname) gehört zur Gattung *Geotrichum*. Taxonomisch ordnet man diesen Pilz jedoch bei den Sprosspilzen ein, zur Klasse der Endomycetes bei den Ascomycota gehörend. Der apathogene Pilz riecht, anbei bemerkt, auch wie ein Hefepilz (also genau, wie Bäckerhefe). *Geotrichum candidum* kommt in Sauermilch, Dickmilch, Joghurt, Quark, Käse (zur Reifung, Aromatisierung) und auf Gemüse (Tomaten!) vor.

Sein Nachweis erfolgt oft im Stuhl, wo er dann die fakultativ-pathogenen Hefepilze überwuchert. Deshalb wird Stuhl am besten bei 37°C bebrütet. Bei dieser Temperatur wachsen die meisten *Geotrichum*-Stämme kaum oder überhaupt nicht, wohingegen alle sonstigen Sprosspilze gut gedeihen (bestes Wachstum von *Geotrichum* bei Raumtemperatur). Gelegentlich kann *Geotrichum candidum* im Vaginalsekret nachgewiesen werden z. B. nach Vaginalspülungen, wenn durch Natur- bzw. Milchprodukte das saure Scheidenmilieu wiederhergestellt werden soll.

Makroskopie

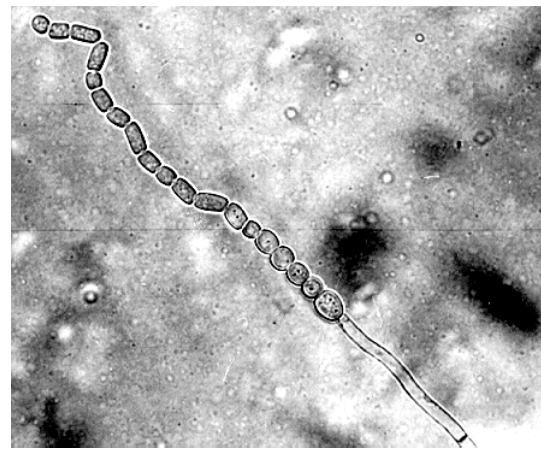
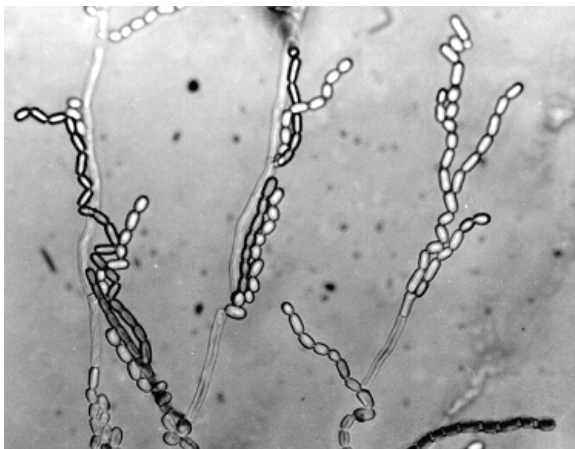
Geotrichum candidum fällt auf durch strahlige, flache, große, matte Kolonien, die manchmal von einem trockenen, weißen, flachen Luftmyzel überzogen sind (speziell, wenn die Kultivierung bei 26°C und nicht bei 37°C erfolgte).

Geotrichum candidum auf Sabouraud-Glukose-Agar



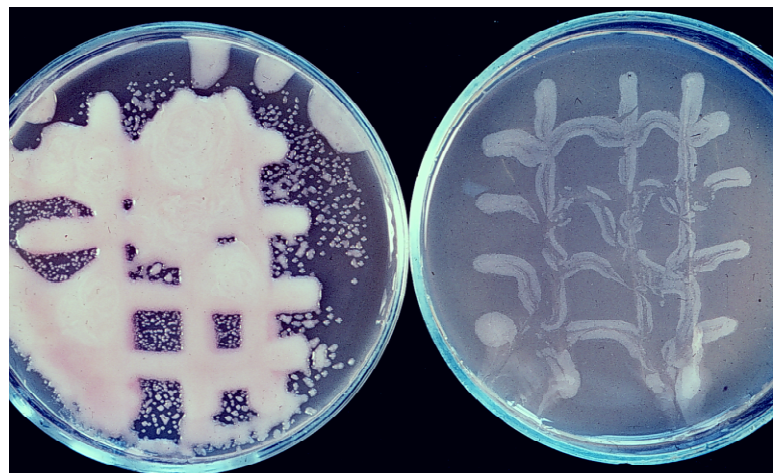
Mikroskopie auf Reis-Agar

- Pseudomyzel (feines weißes Luftmyzel ist möglich)
- Arthrosporen (Gliederstücke)
- keine Sprosszellen (im Gegensatz zur Gattung *Trichosporon*)



Sporobolomyces salmonicolor

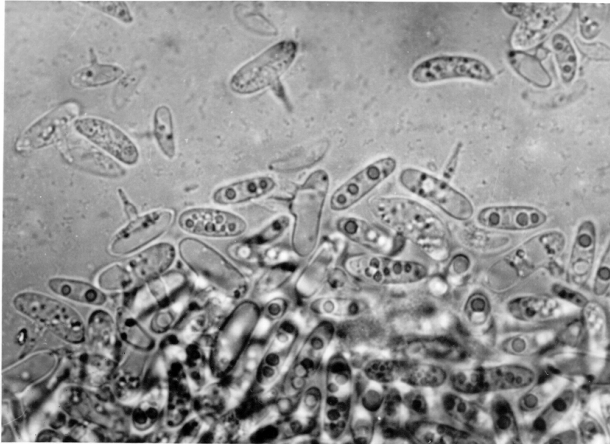
Das Isolat stammt aus der Routinediagnostik des Medizinisch-mikrobiologischen Labors von Dr. Jürgen Herrmann, Mölbis bei Leipzig. Der Sprosspilz ist eher nicht pathogen für Mensch und Tier. Isolierung von Haut oder Fell ist deshalb in der Regel als sekundäre Besiedlung pathologisch veränderten Gewebes oder im Sinne einer Kontamination zu verstehen.



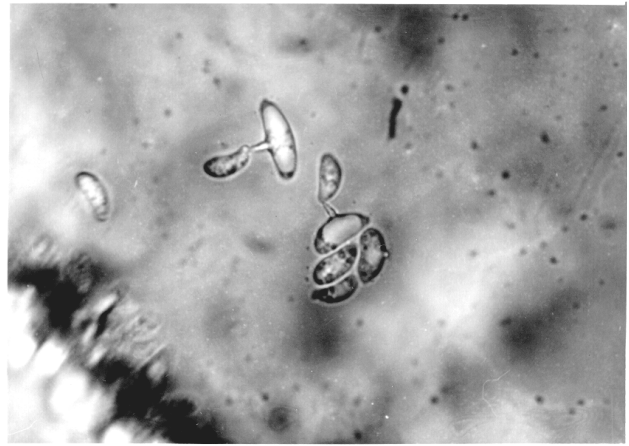
Makroskopie

Typisch sind rötlich bis lachsrote Kolonien mit fester Konsistenz und unregelmäßigem Oberflächenprofil. An der Peripherie der Kolonien entsteht gelegentlich ein submers wachsendes Luftmyzel. Aufgrund der eindrucksvollen Fähigkeit der Hefe, Schleudersporen auszusenden, sind nach wenigen Tagen Kultivierung auf Sabouraud-Glukose-Agar viele kleine Kolonien in der Umgebung des Impfstreiches zu sehen, manchmal sogar als spiegelbildlich zur Kulturform im Petrischalendeckel entstandenes Bild!!!

Mikroskopie auf Reisagar



Die Sprosszellen sind langgestreckt, an zwei Polen verjüngt, bisweilen in der Mitte eingeschnürt. Pseudomyzel wird gebildet. Von der Myzelspitze werden nieren- oder sichelförmige Ballistosporen (Schleudersporen) abgeschleudert!

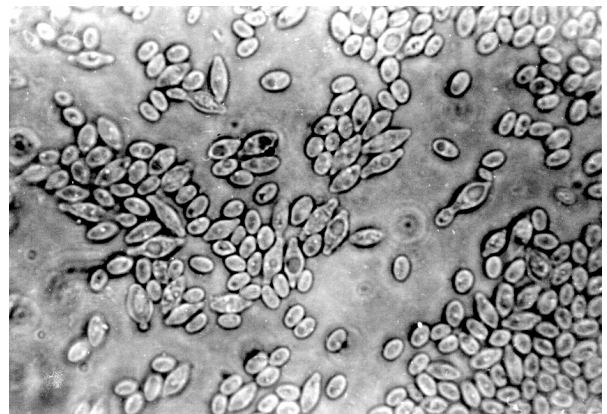


Kloeckera apiculata

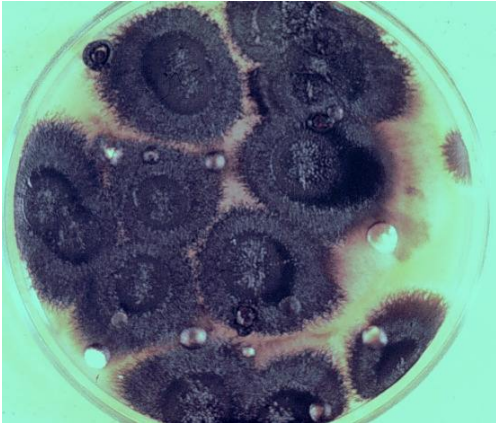
Der Hefepilz ist in der Regel nur als Kontamination anzusehen. Gelegentlich wird er aus Vogelkot isoliert. *Kloeckera apiculata* wächst nicht bei 37°C.

Mikroskopie auf Reis-Agar

Typisch sind die ovalen, an beiden Polen spitz zulaufenden Sprosszellen. Sprossung an beiden Polen möglich. Daraus resultiert die charakteristische, nicht zu verkennende Form der Zellen, die fast an eine Spindel erinnert .



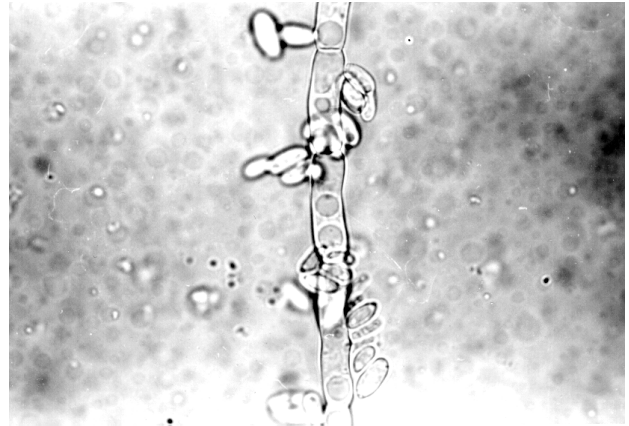
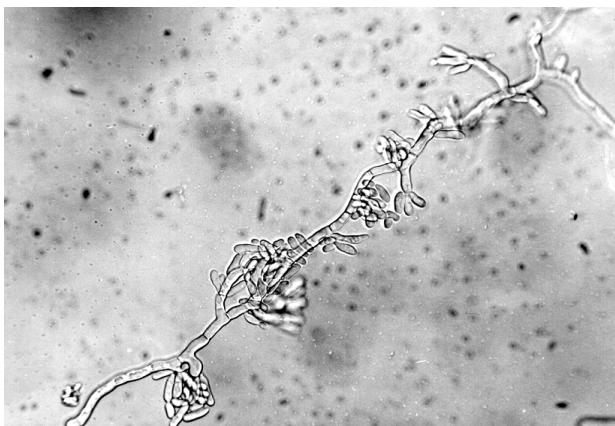
Aureobasidium pullulans



Der flach und schnell wachsende Hefepilz ist beige, creme-farben (manchmal rosa tingiert) und kann jedoch auch braun-schwarzes Pigment auf der Oberseite ausbilden . Es handelt sich immer um saprophytäres Wachstum, z. B. auf feuchtem Holz, selten Isolation von Haut, Nägeln, dann immer als Kontamination anzusehen.

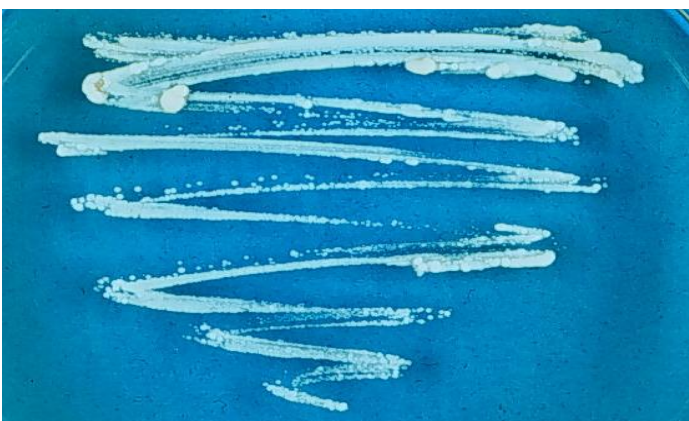
Mikroskopie auf Reis-Agar

Mikroskopisch sind birnenförmige Konidien direkt an den feinen Hyphen zu sehen. Älteres Myzel formt zahlreiche dickwandige, dunkel pigmentierte, fast rechteckige Zellen, die als „Keimschläuche“ imponieren und mehrere Konidien gleichzeitig entlassen .



Malassezia pachydermatis

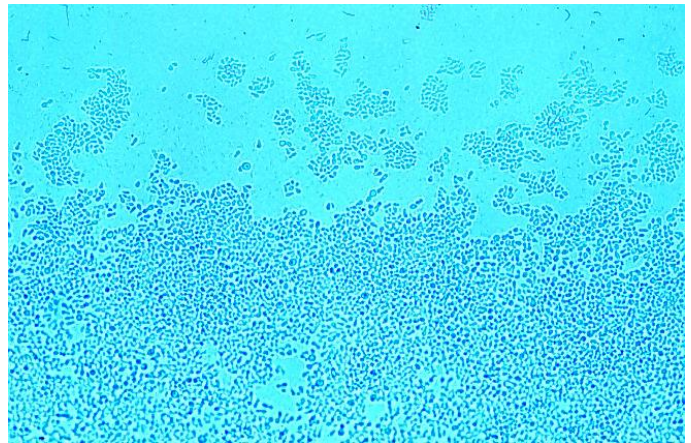
Die Spezies *Malassezia pachydermatis* ist die einzige eine nicht-lipophile Hefe in der Gattung *Malassezia* und wird in der Tiermedizin u. a. als Erreger der Otitis externa beim Hund isoliert, daneben gibt es Beschreibungen über Fungämien bei abwehrgeschwächten Patienten, v. a. Kindern/Früh- und Neugeborenen.



Malassezia pachydermatis kleine, teils glatte, teils rauhe, beige Kolonien mit unregelmäßiger Begrenzung, wächst besser bzw. z. T. **nur** bei 37°C auf Sabouraud-4%-Glukose-Agar ohne Zusätze von Lipiden

Mikroskopie

Malassezia pachydermatis: Auf Reis-Agar sieht man sehr kleine, ovale, z. T. flaschenförmige Sprosszellen, die zumindest in Bezug auf die Größe mit *Candida glabrata* oder *Candida guilliermondii* verwechselt werden können.

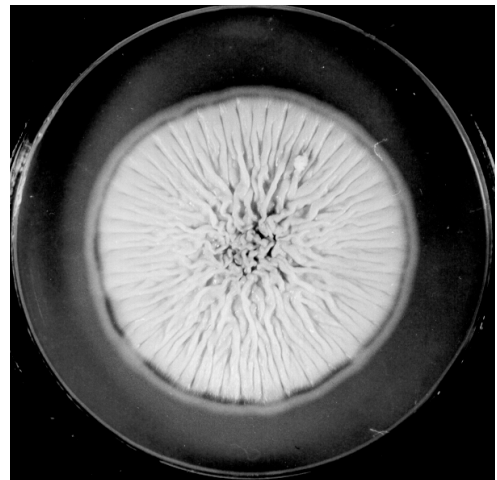


Sporothrix schenckii

Sporothrix schenckii ist eigentlich kein Sprosspilz im klassischen Sinne, sondern ein dimorpher Pilz. Es handelt sich um einen Erreger von Verletzungsmykosen (sporotrichoid, d. h. lymphogen fortgeleitet) vor allem an den unteren Extremitäten (z. B. beim Barfußlaufen). Histologisch imponiert eine granulomatöse Entzündung mit zigarrenförmigen Sprosszellen und sogenannten asteroid bodies.

Makroskopie

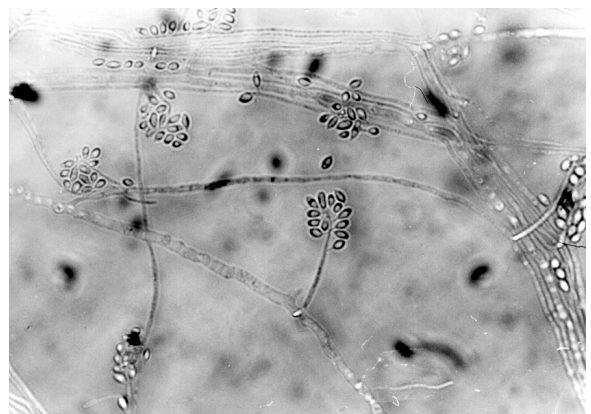
Sporothrix schenckii ist durch zähe, weiß-gelbliche, evtl. später schwärzliche Kolonien mit wenig Luftmyzel, aber mehr submers wachsendem Myzel gekennzeichnet .



Mikroskopie auf Reis-Agar

Entweder sind längliche Hefezellen oder Einzelkonidien, auf kleinen Stielchen oder an verklebten, gebündelten Konidiophoren zu finden. Oder es kommt zur Ausbildung von sog. Margeriten-Formen, d. h. blütenartig angeordnete Konidien auf Hyphenstielen (Konidiophoren).

Sporothrix schenckii - Margeritenblüten-artige Anordnung der Sporen



Danksagung

Frau Dr. Christina Schönborn, vormals Leiterin des Mykologischen Labors der Universitätsklinik Leipzig, gilt Dank für einen Teil der mikroskopischen Fotografien.

Frau G. Lehmann & Frau R. Pestel aus dem Mykologischen Labor der Hautklinik sei herzlich gedankt für die sorgfältige und immense Arbeit bei der Vorbereitung der Pilzkulturen für den Differenzierungskurs.

Literaturverzeichnis

- Campbell CK, Johnson EM, Philpot CM, Warnock DW (1996) Identification of pathogenic fungi. Public Health Laboratory Service London
- De Hoog GS, Guarro J (1995) Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn and Delft, The Netherlands & Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain
- Gedek B (1968) Hefen als Krankheitserreger bei Tieren. In: Bieling R, Kathe J, Köhler W, Mayr A (Hrsg.) Infektionskrankheiten und ihre Erreger. Eine Sammlung von Monographien. Band 7, Gustav Fischer Verlag Jena
- Kurtzman CP, Fell JW (1998) The yeasts. A taxonomic study. 4th Edition, Elsevier, Amsterdam Lausanne New York Oxford Shannon Singapore Tokyo
- Nenoff P, Mügge C, Haustein U-F (2000) Differenzierung der wichtigsten fakultativ-pathogenen und apathogenen Sprosspilze. Teil I: *Candida*. Derm Praktische Dermatologie, Heft 6, im Druck
- Nenoff P, Mügge C, Haustein U-F (2000) Differenzierung der wichtigsten fakultativ-pathogenen und apathogenen Sprosspilze. Teil II: *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Kloeckera*, *Aureobasidium*, *Malassezia* und *Sporothrix*. Derm Praktische Dermatologie, Heft 6, im Druck
- Peltroche-Llacsahuanga H, Jenster A, Lütticken R, Haase G (1999) Novel microtiter plate format for testing germ tube formation and proposal of a cost-effective scheme for yeast identification in a clinical laboratory. Diagn Microbiol Infect Dis 35, 197-204
- Peltroche-Llacsahuanga H, Schnitzler N, Lütticken R, Haase G (1999) Rapid identification of *Candida glabrata* by using a dipstick to detect trehalase-generated glucose. J Clin Microbiol 37, 202-205
- Seebacher C, Blaschke-Hellmessen R (1990) Mykosen. 1. Auflage, Jena, Gustav Fischer-Verlag
- Seeliger HRP, Heymer T (1981) Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt. Lehrbuch und Atlas. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York
- St. Germain BS & Summerbell R (1996) Identifying filamentous fungi. A clinical Handbook. Star Publishing Company, Belmont, California, USA
- Tietz HJ, Ulbricht H (1999) Humanpathogene Pilze der Haut und Schleimhaut. Entnahme, Anzucht und Differenzierung. 1. Auflage, Hannover, Schlütersche Verlag und Druckerei GmbH
- Wilmer A, Hipler U-C, Neumann E, Wollina U (1997) Wertigkeit des „CHROMagar Candida“ zur Differenzierung wichtiger humanpathogener Candidaspezies. Zeitschrift für Dermatologie 183, 19-24