

Eigenlabor in der Hautarztpraxis – Teil 1

Mykologie, Gonokokken-Nachweis und Andrologie für die Praxis

PIETRO NENOFF, CONSTANZE KRÜGER, SONJA GRUNEWALD, HANS-JÜRGEN GLANDER, UWE PAASCH, RALPH M. TRÜEB, KIRSTEN JUNG, GUDRUN HAMM

Es ist nach wie vor ein besonderer Vorzug des Fachgebietes Haut- und Geschlechtskrankheiten, dass (Labor-)Diagnostik und Therapie in einer Hand liegen. Hautärzte, die in der eigenen Praxis aktiv Laboruntersuchungen durchführen, merken jedoch, dass die Rahmenbedingungen dafür immer schwieriger werden. Es gilt, die Richtlinien der Ärztekammer für die interne und externe Qualitätssicherung durchzusetzen.

Im April 2010 ist eine Richtlinie der Bundesärztekammer, kurz RiliBÄK, zur Labordiagnostik in Kraft getreten. Sämtliche Labore, also auch das Praxislabor des Dermatologen, benötigen seit dem 1. April 2010 ein Qualitäts-Management-System (QMS), dessen Anforderungen im Teil A der RiliBÄK formuliert werden [1]. Die Abrechnungsmöglichkeiten gegenüber der KV sind immer restriktiver, sodass gerade kleine Laboreinrichtungen Schwierigkeiten haben, in diesem Bereich trotzdem kostendeckend zu arbeiten.

Man unterscheidet zwischen den allgemeinen Laboruntersuchungen, die prinzipiell in jeder Arztpraxis durchgeführt werden können (Tab. 1), und den fach-

spezifischen Laborleistungen in der Dermatologie (Tab. 2). Letztere zählen zur Kernkompetenz des Facharztes für Haut- und Geschlechtskrankheiten. Die Erhaltung dieser fachspezifischen dermatologischen Laboruntersuchungen auch in der Zukunft ist eng an die qualitätsgerechte Durchführung in der Hautarztpraxis geknüpft. Die Expertise, über welche ganz sicher die Mehrheit der Dermatologen im deutschsprachigen Raum verfügt, muss jedoch gerade durch die nachwachsende jüngere Generation der Hautärzte immer wieder neu erworben werden. Basis ist die Facharztausbildung, die an den Hautkliniken eben auch die einzelnen Laborbereiche umfassen sollte. Die einmal erworbene Expertise muss im Rahmen

von Ringversuchen (z. B. Mykologie, IgE-Bestimmung) immer wieder unter Beweis gestellt werden.

Es ist nicht möglich, hier alle in Tab. 1 und 2 aufgeführten Laborleistungen darzustellen. Der CME-Artikel fokussiert deshalb auf eine Auswahl der wesentlichen fachspezifischen dermatologischen Laborleistungen.

Teil 1 beschäftigt sich mit der Mykologie, insbesondere mit den mikroskopischen Präparaten zum Pilznachweis, der mykologischen Kultur und Differenzierung der Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze, dem Gram-Präparat zum Nachweis von *Neisseria gonorrhoeae* und der Gonokokkenkultur sowie der andrologischen Labordiagnostik.

Der folgende Teil 2 wird dann auf das Trichogramm, die allergologische In vitro-Diagnostik in der Hautarztpraxis und die Autoimmundiagnostik eingehen.

Mykologie

Mikroskopischer Nachweis von Pilzen

Grundlagen des mykologischen Präparates

Einfachste Methode des mikroskopischen Pilznachweises in Hautschuppen, Nagelmaterial und Haarwurzeln ist das Präparat mit 20%iger Kalilauge (KOH), alternativ mit Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH). Die empfindlichste Technik zum mikroskopischen Pilznachweis in Hautschuppen, Nagelspänen, Haarwurzeln, Haaren sowie Tesa-Film-Abrissen der Haut ist jedoch die Fluoreszenzfärbung mit optischen Aufhellern aus der Gruppe der Diaminostilbene. Diese binden sich an Chitin, den Hauptbestandteil der Zellwand der

Allgemeine Laborleistungen, die in der dermatologischen Praxis vorgehalten werden können

Tabelle 1

- BSR (Blutsenkungsreaktion)
- Glucose i.S.
- Einfache Urindiagnostik (Urin-Status inklusive Eiweiß und Glukose, Urin-Sediment)
- Mikroskopische Untersuchung eines Körpermaterials als Nativpräparat oder nach einfacher Färbung (Methylenblaupräparat, Kalilaugen-Präparat)
- Mikroskopische Untersuchung eines Körpermaterials nach differenzierender Färbung (Calcofluor- oder Blankophor-Präparat)
- Einfache kulturelle mikrobiologische Untersuchung (Eintauchnährböden/Urin)

Fachspezifische Laborleistungen in der Dermatologie	
Andrologische Diagnostik	Spermiogramm mit immunologischer, biochemischer und mikrobiologischer Ejakulatuntersuchung
Allergologie	Gesamt-IgE und spezifisches IgE, ggf. Trypsase
Autoimmundiagnostik	Antinukleäre Faktoren (ANF)
Mykologie	Mykologisches Nativpräparat/Fluoreszenzoptisches Präparat Mykologische Kultur Differenzierung von Dermatophyten und Schimmelpilzen Morphologische und biochemische Differenzierung von Hefepilzen (Resistenzbestimmungen)
Sexuell übertragbare Erkrankungen (STD)	Mikroskopische Untersuchung eines Körpermaterials auf Treponemen (Dunkelfeldmikroskopie) Syphilis-Serologie (Cardiolipinmikroflokkungstest CMT], Venereal Disease Laboratory Test [VDRL], Treponema-pallidum-Hämagglutinations-Test [TPHA]) Gonokokkenkultur Trichomonadenkultur
Trichogramm	

Tabelle 2

Pilze. Verfügbare Farbstoffe sind Blankophor® oder Calcofluor®. Die Gebrauchslösung wird mit 20%iger KOH-Lösung hergestellt. Mittels Fluoreszenzmikroskop werden Sporen, Sprosszellen, bis zu den sehr kleinen Malassezia-Sprosszellen sowie Hyphenstücke und Arthrosporen (zerfallendes Myzel) unterschieden.

KOH- und TEAH-Präparat

Schuppen, Nagelspäne oder Haare werden mit einem Tropfen KOH-Lösung auf den Objektträger gebracht und am

besten über Nacht, mindestens jedoch 2 Stunden, in der „feuchten Kammer“ inkubiert. Die mikroskopische Beurteilung auf Pilzhyphen und Arthrosporen erfolgt mit dem 10er- und 40er-Objektiv (Abb. 1).

Eine Alternative zu diesem Vorgehen stellt das Präparat mit 20%iger Tetraethylammoniumhydroxid-Lösung dar. Hierbei ist eine sofortige mikroskopische Beurteilung möglich. Ein Nachteil der Methode ist es, dass die Pilzelemente bereits nach mehreren Stunden zersetzt werden.



Abb. 1: Kalilaugen-Präparat mit Nachweis von septierten Hyphen eines Dermatophyten in Hautschuppen. Eine Gattungs- oder Art-Differenzierung ist nicht möglich.

Fluoreszenzoptisches Pilzpräparat

Haut- oder Nagelmaterial (mindestens 5-10 Hautschüppchen oder Nagelspäne) werden mittels steriler (abgeflammter) Impföse in einen Tropfen Blankophor® oder Calcofluor®-Lösung auf einen Objektträger gegeben, darauf kommt ein Deckgläschen. Inkubiert wird über Nacht bei Raumtemperatur in einer „feuchten Kammer“. Tesa-Film (Abrisspräparat von der Haut) wird auf dem Objektträger in einen Tropfen Calcofluor/Blankophor-Lösung geklebt und ebenfalls in „feuchter Kammer“ inkubiert. Die Präparate werden mittels Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Aussage des KOH- und fluoreszenzoptischen Präparates

Da ein positives KOH- und fluoreszenzoptisches Präparat keine Aussage bezüglich der Gattung oder Art des Pilzes erlaubt und das Präparat auch falsch-positiv oder falsch-negativ sein kann, ist zur Isolierung bzw. nachfolgenden Differenzierung des Erregers die mykologische Kultur unabdingbar. Malassezia-Hefezellen im Präparat von Kopfschuppen lassen zwar den Schluss auf die Gattung Malassezia zu, die einzelne Art, z. B. Malassezia furfur, kann jedoch nicht differenziert werden. Nur die Pityriasis versicolor ist anhand der in Haufen gelagerten Sprosszellen und der kurzen, gebogenen Hyphen (Malassezia spp.) eindeutig mikroskopisch zu identifizieren.

Kultureller Pilznachweis

Testprinzip

Pilze sind heterotrophe Mikroorganismen. Die Nährmedien enthalten deshalb die für Wachstum und Fortpflanzung nötigen organischen Nährstoffe, u. a. eine Kohlenstoff-Quelle (Glukose), eine Stickstoff-Quelle (Pepton, Fleischextrakt), Wasser, Vitamine, außerdem Antibiotika.

Von jeder Materialprobe sollten zwei Nährböden beimpft werden, einer davon enthält Cycloheximid (Actidion®) zur Unterdrückung des Schimmelpilzwachstums.

Der Ansatz wird bei 26–32 °C, am besten bei 28 °C, über drei (ggf. 4) Wochen inkubiert und mindestens zweimal wöchentlich visuell auf Pilzwachstum kontrolliert [2, 3]. Die Differenzierung

der Dermatophyten, Hefe- und Schimmelpilze erfolgt anhand makromorphologischer (Kolonieober- und -unterseite, sowie Pigmentierung) und mikromorphologischer Charakteristika (Ausbildung von Makro- und Mikrokonidien bzw. anderer Wachstumsformen) sowie biochemischer Eigenschaften [4].

Präanalytik

Eine Lokalbehandlung, insbesondere mit antimykotischen Lacken, sollte mindestens zwei, besser vier Wochen vor der Untersuchung ausgesetzt worden sein, da das Ergebnis der Pilzkultur sonst falsch-negativ ausfallen kann. Der dystrophisch veränderte Nagel wird soweit abgetragen, dass das Material zur Pilzuntersuchung möglichst weit proximal entnommen werden kann. Lebende Pilze sind vorzugsweise an der Grenze zwischen der mykotischen Veränderung und der gesunden Restnagelplatte zu finden. Durch Desinfektion der Entnahmestelle mit 70%igem Ethanol erreicht man eine Reduktion von hautbesiedelnden Bakterien und Schimmelpilzsporen („Anflugkeime“) [5].

Nägelspäne werden mit Skalpell oder scharfem Löffel von der Oberfläche bis in die Tiefe des Nagels abgehobelt [6]. Als günstig hat sich die Materialentnahme mit Fräse erwiesen. Die faserigen, oft krümeligen Bestandteile der subungualen Hyperkeratosen enthalten am ehesten vitale Pilzelemente. Die zur Untersuchung gelangenden Nagelpartikel sollten klein, aber zahlreich sein. Analog dazu werden Hautschuppen von trockenen Läsionen ebenfalls an der Grenze zum Gesunden mit dem Skalpell abgekratzt. Die vorherige Desinfektion ist in diesem Fall optional.

Durchführung der Methode

Standardnährmedien für mykologische Untersuchungen sind Sabouraud-Glukose-Agar, der Pepton und Glukose (2 oder 4 %) enthält (international üblicher Standardnährboden), oder der alternativ einsetzbare Kimmig-Agar (zusätzliche Bestandteile sind NaCl und Glycerin; stimuliert Konidien- und Pigmentbildung, reduziert jedoch die Wachstumsgeschwindigkeit). Beide Medien enthalten Antibiotika (z. B. Chloramphenicol 50 mg/l, Penicillin/Streptomycin 40.000



Abb. 2: Trichophyton rubrum: Wachstum auf Sabouraud-4 % Glukose-Nährmedium mit (links) und ohne (rechts) Cycloheximid (Actidion) in Schrägagar-Röhrchen. T. rubrum ist, wie alle Dermatophyten, resistent gegenüber Cycloheximid, wird also nicht im Wachstum gehemmt.

IE/l), um das Bakterienwachstum zu unterdrücken.

Für die selektive Anzucht von Dermatophyten und einigen Sproßpilzen kommt der Basisnährboden Sabouraud-Glukose-Agar + Actidion® (= Cycloheximid) zur Anwendung. Cycloheximid (isoliert aus Streptomyces noursei) ist ein Hemmstoff des Wachstums von Schimmelpilzen und einigen Sproßpilzen. Alternativ kann man auch den kommerziell erhältlichen Mycosel®-Agar (z. B. Becton Dickinson, Heidelberg) verwenden. Dieser enthält bereits Cycloheximid.

Immer zwei Nährböden – einer mit, einer ohne Cycloheximid – werden beimpft. Meist verwendet man Nährmedien in Petrischalen, alternativ jedoch auch sog. Schrägagar-Röhrchen (Abb. 2). Dazu gibt man Hautschuppen oder Nagelspäne bzw. Haarwurzeln mittels steriler (abgeflammter) (Platin-)Impföse auf den Nährboden. Für Calcofluor-Präparat und Beimpfen der Nährmedien sind separate Impfösen zu verwenden, da die im Calcofluor-Reagenz enthaltene KOH das Wachstum der Pilze stören kann. Die Mindest-Probenmenge beträgt auch hier 5–10 Hautschüppchen oder Nagelspäne. Analog dazu sind Abstriche von der Haut auf die Nährmedien auszustreichen.

Differenzierung der Dermatophyten

Die Unterscheidung der einzelnen Dermatophyten erfolgt aufgrund ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften.

Die makroskopische Differenzierung stützt sich auf die Eigenschaften Wachstumsgeschwindigkeit, Struktur und Kon-

sistenz der Kolonien sowie Pigmentierung der Kolonieober- und -unterseite.

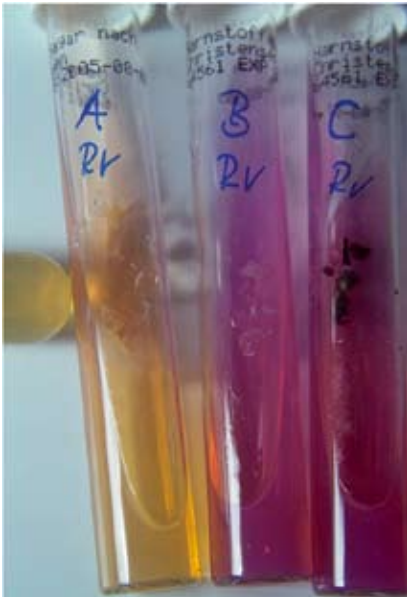
Dermatophyten sind gekennzeichnet durch folgende makroskopischen Merkmale:

- Oberseite oft flaumig, wollig und weiß mit Bildung von Luftmyzel (= echtes Myzel)
- gelegentlich violett, rötlich, orange, grünlich oder gelblich-weiß gefärbtes Luftmyzel
- Unterseite pigmentiert, oft rotbraun, purpurn, manchmal gelb-braun, leuchtend-gelb, beige
- Pigment (Farbstoff) diffundiert kaum in den Nährboden
- Unterseite der Kolonien (Fruchtkörper = Thallus) ist glatt, nicht gefurcht oder gefaltet

Für die mikroskopische Identifizierung nutzt man Mikrostrukturen, wie Spirallyphen, Arthrosporen, Chlamydosporien, Makro- und Mikrokonidien. Die Makrokonidien stellen die Grundlage der Gattungsdiagnose dar. Zur Identifizierung einzelner Dermatophyten-Arten sei auf die weiterführende Literatur verwiesen [7, 8].

Methoden der physiologischen Differenzierung

Physiologische Tests sind hilfreich, wenn die Morphologie keine eindeutige Artbestimmung zulässt. Geprüft werden Temperaturempfindlichkeit, Pigmentbildung, Vitaminabhängigkeit, NaCl-Empfindlichkeit, Enzymaktivitäten, Haarperforation und pH-Änderung. Dazu werden spezielle Nährböden benötigt: Kartoffel-Dextrose-Agar, Hafermehl-Agar, polierter Reis, Wort-Agar,



© P. Nenoff

Abb. 3: Harnstoffspaltung (Indikator: Phenolphthalein, reaktiv = Rotfärbung des Agars) auf Harnstoffagar nach Christensen (z. B. Heipha Diagnostika Dr. Müller GmbH, Heidelberg). Unterscheidung von *T. rubrum* (A, negativ), *T. interdigitale* (B, positiv) und *T. ajelloi* (C, positiv).

Czapek-Dox-Agar, Harnstoff-Agar, Trichophyton-Agar Nr. 1–6, NaCl-supplementierter Agar, Bromkresolpurpur-Milch-Agar u. a.

Entscheidend ist der Urease-Test, mit dem man die Fähigkeit zur Harnstoffspaltung und deren Schnelligkeit bestimmt. Trichophyton (*T.*) mentagrophytes (neue Taxonomie: *T. interdigitale*) bewirkt einen Farbumschlag von gelb nach rot innerhalb von 7 Tagen, *T. rubrum* spaltet Harnstoff nicht bzw. benötigt dafür mindestens 14 Tage. Ursprünglich eingesetzt für die Differenzierung von *T. rubrum* und *T. interdigitale*, lässt die Harnstoffspaltung aber auch Rückschlüsse auf andere Dermatophyten-Arten zu (Abb. 3).

Dermatophyten reagieren auf bestimmte Protein- oder Aminosäuren im Nährmedium mit besserem Wachstum. Ebenso besteht eine Autotrophie für Vitamine. Ausnahmen sind:

- *T. tonsurans*: Stimulation durch Thiamin
- *T. verrucosum*: Stimulation eines Teiles der Stämme durch Inosit

Als Basisnährboden verwendet man vitaminfreien Casein-Agar bzw. Ammoniumnitrat-Agar.

Differenzierung der Hefepilze

Wichtige Identifizierungskriterien der einzelnen Hefepilzgattungen sind u. a.:

- Makromorphologie (Koloniewachstum, -farbe)
- Mikromorphologie (Wachstum auf Reis-Agar)
- Bildung von sexuellen (Asco-) und/oder asexuellen (Blasto-)Sporen
- Stoffwechselleistungen: biochemische Differenzierung (Assimilation und Fermentation von Kohlehydrat- und Stickstoffquellen)
- Wachstumsfähigkeit bei 37 °C

Hefepilze haben folgende makroskopische Merkmale:

- weiße bis beige, u. U. rote Farbe
- glatte, gewölbte, matt glänzende Kolonien, Durchmesser bis 5 mm
- evtl. pseudomyzeliale Elemente, die in den Nährboden einwachsen (= submerses Wachstum der Hefepilze, im Gegensatz zum vegetativen Luftmyzel der Dermatophyten und Schimmelpilze)
- gelegentlich raue (gefaltete, gefurchte) Kulturoberseite
- Anhand der mit dem bloßen Auge sichtbaren Merkmale ist keine Differenzierung möglich!

Ausnahmen sind:

- *Candida* (*C.*) *parapsilosis*: Rauform: faltige, raue Oberfläche (kein Luftmyzel!), cave: glatte Form von *C. parapsilosis*!
- *Trichosporon* spp.: stark gefaltete Oberfläche, zähe Kolonien, die schwer mit der Impföse zu entnehmen sind
- *Rhodotorula* spp.: roter Sproßpilz (apathogene Hefe)

Mikroskopische Differenzierung von Hefepilzen auf Reis-Agar

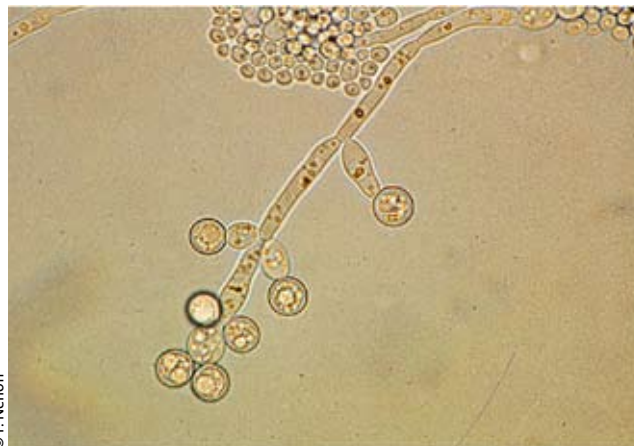
Wenn man Hefepilzkolonien auf Sabouraud-Glukose-Agar unter dem Mikroskop betrachtet, sieht man Sprosszellen, eventuell Pseudomyzel. Eine Gattungs- oder Artidentifizierung ist nicht möglich. Zur mikroskopischen Differenzierung ist eine Subkultur auf Reis-Agar notwendig. Es handelt sich um ein Mangelmedium, das kaum Nährstoffe enthält.

Hefekolonien entnimmt man mit einer Impföse und bringt sie mit drei Impfstrichen auf den Reis-Agar auf, darauf kommt ein steriles Deckglaschen. Nach 24, besser 48 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur können die mikroskopischen Merkmale unter dem 10er- bzw. 40er-Objektiv beurteilt werden:

- ovale bzw. runde Sprosszellen
 - Ausbildung von Pseudomyzel
 - Chlamydosporen-Bildung (Abb. 4, *C. albicans*, ggf. *C. dubliniensis*)
- Die medizinisch relevanten Hefepilzarten bilden artspezifische Strukturen aus Pseudomyzel und Sprosszellen [9].

Zur biochemischen Differenzierung kommt ein chromogener Nährboden, z. B. Chromagar *Candida* (BD, Heidelberg), zur Anwendung. Eine Hefepilzkolonie wird auf dem chromogenen Agar ausgestrichen, die Inkubation erfolgt bei 37 °C über Nacht. Differenzierung entsprechend der Koloniefarbe:

- grün: *C. albicans*,
- blau: *C. tropicalis*,
- violett: *C. glabrata*,
- violett und raue, ausstrahlende Kolonien: *C. krusei* (Abb. 5).



© P. Nenoff

Abb. 4: *Candida albicans*: Ausbildung von Chlamydosporen auf Reis-Agar.

Biochemische Differenzierung von Hefepilzen

Die biochemische Differenzierung basiert auf der Assimilation (Verwertung) und Fermentation (Spaltung) von Kohlehydrat-Quellen (Glukose, Galaktose, Saccharose, D-Xylose, Inosit u. a.) sowie von Stickstoff-Quellen (Pepton, KNO₃). Dazu nutzt man eine kommerziell verfügbare „bunte Reihe“ (z. B. ID 32 C, bioMérieux SA, Marcy/Etoile, France).

Ein ID-32-C-Streifen verfügt über 32 Vertiefungen mit den verschiedenen Kohlehydrat- oder Stickstoffquellen. Der Hefepilz wird in einem halbfesten Minimalmedium suspendiert und anschließend in die Vertiefungen gegeben. Die Inkubation erfolgt bei 30 °C. In Abhängigkeit vom Wachstum wird nach 24 oder nach 48 Stunden anhand eines „Analytischen-Profil-Index“ die Hefepilzart bestimmt. Neuerdings besteht ein Online-Zugang zur Software Apiweb™, die die aktuelle Version des Differenzierungsindex' beinhaltet.

Differenzierung der Schimmelpilze

Ein Großteil der als Laborkontaminationen oder Krankheitserreger bekannten Pilzgattungen lässt sich anhand einfacher morphologischer Merkmale identifizieren (z. B. Aufbau und Färbung der Sporenträger, Form, Wandstärke, Pigmentierung und Septierung der Konidien). Schimmelpilze sind durch schnelles Wachstum (3–10 Tage) gekennzeichnet, sie bilden reichlich Luftmyzel aus und die Kolonien sind grün, blau, braun (Abb. 6) oder schwarz pigmentiert, die Kolonienunterseite ist oft dunkel gefärbt, grau-braun bis schwarz [10].

Mikrobiologischer Nachweis von genitalen Infektionen mit *Neisseria gonorrhoeae*

Mikroskopisches Präparat mittels Gram-Färbung

Im Gegensatz zu vielen anderen Infektionen hat die direkte Mikroskopie bei Verdacht auf Gonorrhö noch immer ihre Berechtigung. Gemeint ist das Grampräparat direkt von Urethralabstrichen bei männlichen und weiblichen Patienten sowie von Zervikalabstrichen bei Frauen. Mikroskopische Präparate von Abstrichen, die in Transportmedien ins Labor gelangen, müssen meist zuvor

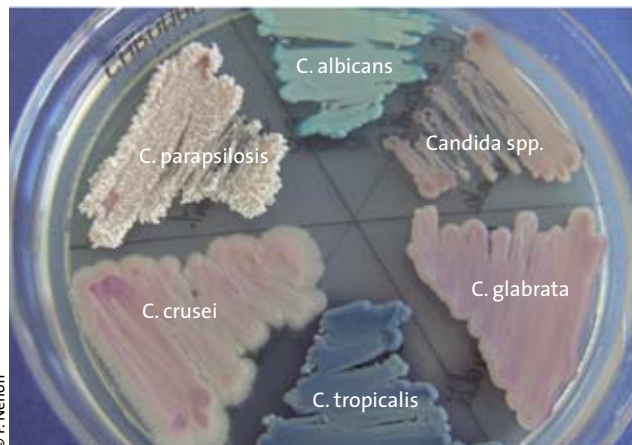


Abb. 5: Hefepilzdifferenzierung mittels Chromagar (Chromagar Candida BD, Becton Dickinson, Heidelberg).



Abb. 6: *Scopulariopsis brevicaulis*: fakultativ-pathogener Schimmelpilz mit typischer zimtbrauner Koloniefarbe, Primärkultur aus Nagelspänen bei Onychomykose des Großzehennagels.

für den kulturellen Ansatz vorbereitet werden. Anhaftendes Material ist dann zum Teil bereits verbraucht, daher ist die Sensitivität solcher Präparate gemindert.

Die Aussagekraft der Mikroskopie ist abhängig von der klinischen Symptomatik und von der technischen Durchführung. Wichtig ist bei der Entnahme von Urethralabstrichen, dass die letzte Miktion einige Stunden zurückliegt. Rachen- und Rektalabstriche eignen sich nur im Zusammenhang mit einer kulturellen Anzucht zur mikroskopischen Diagnostik, weil durch die hohe Rate mikroskopisch ähnlicher Begleitflora kein eindeutiger Beweis des Vorhandenseins von *Neisseria (N.) gonorrhoeae* möglich ist.

Finden sich im Gram-Präparat die typischen kaffeebohnen- oder semmel-förmigen gramnegativen Diplokokken intrazellulär oder intraleukozytär, so kann je nach Abstrichort eine Infektion mit Gonokokken mehr oder weniger sicher angenommen werden. Das Methyleneblau-Präparat kann nur den Hinweis auf das Vorhandensein von Diplokokken geben und ist weniger zu empfehlen.

Kultureller Erregernachweis

Prinzip

In jedem Fall muss sich an das mikroskopische Präparat ein molekularbiologischer Nachweis oder der kulturelle Erregernachweis anschließen. Gemäß EBM muss begründet werden, wenn beide Methoden – PCR und kultureller Nachweis – durchgeführt werden. Aus mikrobiologischer Sicht ist die parallele Verfahrensweise in den meisten Fällen anzustreben, weil durch Nukleinsäureamplifikation auch geringere Erregermengen erfasst werden, die Begleitflora weniger störend ist und auch durch ungünstige Transportbedingungen nicht mehr lebensfähige Bakterien noch nachgewiesen werden können. Ebenso ist die Kultur für ein aktuelles Antibiogramm zwingend nötig. Bei der zunehmend auftretenden Resistenz gegen z. B. Chinolone ist dies wichtig, um Therapieversagen zu vermeiden.

Vorgehen bei der Gonokokken-Kultur

Für den kulturellen Ansatz ist ein direktes Beimpfen der vorgewärmten Nährmedien die optimale Variante. Sehr gute Er-

fahrungen liegen jedoch auch mit Transportmedien vor (häufig Amies- oder Stuart-Medium mit oder ohne Zusatz von Aktivkohle). Hier sind die Gonokokken nach eigenen Erfahrungen und Literaturangaben noch bis zu 48 Stunden nach Entnahme vital und wachsen in der Kultur.

Standardmäßig kommen für die Anzucht der Gonokokken Selektivmedien wie Thayer-Martin-, Martin-Lewis- oder New-York-City-Medium zum Einsatz [11]. Verschiedene Antibiotika- und Antimykotika-Zusätze unterdrücken das Wachstum der Begleitflora und erleichtern das Erkennen positiver Kulturen. Kochblutagar dient als nichtselektives Medium im Ansatz und bei Isolierungen zum Zweck von Reinkulturen. Grundsätzlich erfolgt die Bebrütung bei 37 °C in CO₂-angereicherter Atmosphäre. Der traditionelle Kerzentopf schafft ebenso wie kommerzielle Systeme das erforderliche mikroaerophile Milieu. Nach 24 Stunden sind in den meisten Fällen nur winzige Kolonien sichtbar.

Erst nach 48 Stunden sind glatte, grau-opake Kolonien („Tautropfen“-Form) mit einem Durchmesser zwischen 0,6 und 1,5 mm deutlich erkennbar. Fällt die orientierende Identifizierung mittels Oxidase-reaktion positiv aus, müssen sich zur Bestätigung entweder biochemische Tests, direkte Immunfluoreszenz oder auch DNA-Sonden-basierte Methoden anschließen (z.B. Accuprobe von BioMérieux). Prinzipiell können auf den Selektivmedien auch andere Spezies zur Anzucht gebracht werden und müssen differenzialdiagnostisch von *N. gonorrhoeae* durch die oben genannten Methoden abgegrenzt werden. Eine Reihe kommerzieller Systeme prüft innerhalb weniger Stunden die Stoffwechselleistungen der gezüchteten Bakterien und erlaubt die eindeutige Diagnose.

Resistenztestung der Gonokokken

Die Resistenztestung sollte sich anschließen und kann durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK), Agardilution und -diffusion bzw. mit dem E-Test erfolgen [12]. Orientierend kann im Vorfeld der Nitrocefintest eingesetzt werden, um das Vorhandensein einer Plasmid-kodierten Betalaktamase zu prüfen.

Andrologie

Die Andrologie gehört zum Fach „Haut- und Geschlechtskrankheiten“, das in Deutschland medizinhistorisch die Mutterdisziplin dieses Spezialgebietes ist. Entsprechend wird in der neuen Musterweiterbildungsordnung der „Erwerb von Kenntnissen, Erfahrungen und Fertigkeiten in ... der Erkennung andrologischer Störungen und Indikationsstellung zur weiterführenden Behandlung“ gefordert. Kernstück der andrologischen Labordiagnostik ist die Ejakulatanalyse, die in Form des Basisspermiogramms unter Berücksichtigung der aktuellen WHO-Empfehlungen 2010 [13] und der RiliBäK gut im Hautarzlabor erbracht werden kann.

Grundlagen der andrologischen Labordiagnostik

Die andrologische Diagnostik nur als Ejakulatanalyse aufzufassen, ist ärztlich nicht vertretbar. Der Vergleich mit der Hämatologie liegt nahe, die auch nicht nur auf das Blutbild reduziert werden kann. Die Infertilitätsdiagnostik umfasst immer die Anamnese, klinische Untersuchung, Ejakulatanalyse und Hormonbestimmungen sowie bedarfsweise erweiterte Labordiagnostik hinsichtlich Spermienfunktionen, Seminalplasma und Hodengewebe. Bis auf die erweiterte Diagnostik kann dies vom Dermatologen erbracht werden. Im Hinblick auf die Möglichkeiten der modernen Methoden der assistierten Reproduktion ermöglicht diese Basisdiagnostik die Identifizierung möglicher Ursachen einer Fertilitätsstörung und lässt erste Aussagen über deren Schweregrad und Therapierbarkeit zu.

Die endokrinologische Basisdiagnostik umfasst in erster Linie die Bestimmung der Basiskonzentrationen von LH, FSH und Testosteron im Serum, die meist von spezialisierten Laboratorien vorgenommen werden. Die FSH-Serumkonzentrationen zeigen einerseits in weiten Grenzen eine positive Korrelation mit dem Schädigungsgrad der Spermatogenese, andererseits eine negative Korrelation mit Hodenvolumen und Spermiengesamtzahl im Ejakulat. Die Bestimmung des Inhibin-B erlaubt eine verbesserte Aussage der Fertilitätsreserve. Die Untersuchungen des Ejakulates hingegen sollten vor Ort erfolgen, da ein Probenversand bzw. Pro-

bentransport meist die Werte verfälscht und daher vermieden werden sollte. (Zu den Besonderheiten der andrologischen Anamnese und der Erhebung des klinischen Status siehe [14]).

Ejakulatuntersuchungen

Die Frage nach den Labormethoden zur Einschätzung der männlichen Fertilität muss unter Bezugnahme auf das Fertilisierungspotential der Spermatozoen in vivo beantwortet werden: Es werden motile, normomorphe Spermien mit intakter Membranstruktur und -funktion sowie physiologisch gepackter DNA benötigt, die in der Lage sind, die Eizelle zu erreichen, an Eizellstrukturen zu binden, die Eizelhüllen zu penetrieren und mit dem haploiden Chromosomensatz eine normale Embryogenese zu induzieren. Spermienfunktionstests repräsentierten in vitro Labormodelle von Teilschritten des Fertilisierungsprozesses in vivo. Das Basis-Spermiogramm ist dabei nur der erste Schritt der andrologischen Labordiagnostik mit dem Charakter einer Screening-Untersuchung. Da spezialisierte Zentren nicht allerorten verfügbar sind, gewinnt dieses Screening für eine erste und schnelle Orientierung an Bedeutung. Um eine verlässliche Befundung des Ejakulates zu garantieren, sind einige Regeln zu beachten.

Laborausstattung

Die Basisausstattung sollte neben einem geeigneten Gewinnungsraum ein Phasenkontrast-Mikroskop, zugelassene Zählkammern (Abb. 7), Pipetten, Wärmeplatte (-kammer), Färbvorrichtung, Präzisionswaage oder graduierte Probengefäße sowie die benötigten Chemikalien umfassen.

Ejakulatgewinnung

Das Ejakulat sollte nach Gewinnung keinen extremen mechanischen Belastungen, Temperaturen, Erregern und spermientoxischen Substanzen ausgesetzt sein. Die Karenzzeit sollte unbedingt beachtet werden und 2 bis 7 Tage betragen. Wichtig ist, das Ejakulat in seiner Gesamtheit zur Diagnostik zu bringen. Als Probengefäße eignen sich graduierte Zylinder oder andere sterile Probengefäße, die vor und nach Gewinnung ausgewogen werden.



Abb. 7: Zählkammer zur Quantifizierung der Spermien im Ejakulat.

Morphologie erfolgt nach Ausstrichfärbung (Tab. 3 und 4).

Qualitätssicherung

Nach den neuesten Richtlinien der Bundesärztekammer ist eine Teilnahme an Maßnahmen zur Qualitätssicherung verpflichtend. Die Organisation der externen Qualitätssicherung ist einfach via Teilnahme z.B. am QuaDeGA-Programm der Deutschen Gesellschaft für Andrologie DGA zu realisieren. Wesent-

Tabelle 3

Parameter und Referenzwerte des Basis-Spermiogramms (nach WHO 2010, [1])

Ejakulatvariable	Referenzwerte	Hinweise zur Methodik
Volumen	≥ 1,5 ml	z.B. skaliertes Zentrifugenröhrchen
pH	7.2 – 8,0	Indikator-Papier
Verflüssigungszeit	15 bis 60 min.	
Spermatozoenkonzentration	≥ 15 x 10 ⁶ pro ml	z.B. Neubauer-Zählkammer, nach Verdünnung mit immobilisierender Lösung
Gesamtpermatozoenzahl	≥ 39 x 10 ⁶ pro Ejakulat	
Motilität	≥ 40 % Gesamtmotilität ≥ 32 % mit Vorwärtsbeweglichkeit	Nativpräparate (ca. 10 µl) im Phasenkontrast, 400-fache Vergrößerung
Morphologie	(≥ 4 % Spermatozoen mit normaler Morphologie)	Färbung von Ausstrichpräparaten nach Papanicolaou und/oder Shorr; ggf. Schnellfärbung (z. B. Hemacolor®)
Vitalität	≥ 58 % vital, d.h. Spermatozoen, die keinen Farbstoff annehmen	Färbung mit 0,5 % Eosin („rot = tot“)
Leukozyten	< 1 x 10 ⁶ /ml	Bestimmung Peroxidase-positiver Zellen

Tabelle 4

Spermiogramm-Nomenklatur (nach WHO 2010, [1])

Normozoospermie	Normale Ejakulatbefunde
Oligozoospermie	< 15 x 10 ⁶ Spermatozoen/ml
Asthenozoospermie	Einschränkung der Motilität (weniger als 40 % motile Spermien)
Teratozoospermie	Verminderung des Anteils normomorpher Spermien unter 4 %
Oligoastheneratozoospermie	Alle drei Variablen sind gestört („OAT-Syndrom“)
Nekrozoospermie	Keine vitalen Spermatozoen
Azoospermie	Keine Spermatozoen im Ejakulat
Hypospermie (Parvisemie)	Ejakulatvolumen < 1,5 ml
Aspermie	Kein Ejakulat

Ejakulatuntersuchung

Das Basis-Spermiogramm umfasst die Angaben folgender Variablen: Volumen, pH-Wert, Viskosität, Farbe, Geruch und Verflüssigungszeit. Nach Beurteilung im Nativpräparat erfolgt die Bestimmung der Spermien-Konzentration (in Mill.

Spermien/ml) und Gesamtzahl (pro Ejakulat) sowie die Differenzierung der Spermien-Motilität in progressiv motil, lokal motil und immotil (Angabe in %). Die Spermien-Vitalität wird mittels Eosin-Y-Färbung evaluiert (% vitale Spermien), die Differenzierung der Spermien-

licher Baustein einer qualitätsgesicherten Ejakulatuntersuchung ist die Dokumentation. Am Einfachsten und Übersichtlichsten gelingt dies in Tabellenform.

Interpretation der Spermiogramme

Die Interpretation der spermiologischen Untersuchungsergebnisse bereitet oft Schwierigkeiten, weil einerseits Männer mit normalen Spermiogramm-Ergebnissen nicht in der Lage waren, eine Konzeption zu erreichen und andererseits pathologisch eingestufte Proben sich als fertil erwiesen. Die Ejakulatuntersuchung allein erlaubt keine Diagnosestellung. Begriffe wie „Oligo-Asthenoteratozoospermie“ oder „OAT-Syndrom“ haben nur deskriptiven Charakter! Es müssen für eine erste Einordnung der Befunde die Anamnese, der klinische Befund und die endokrinologische Situation im Kontext der erhobenen Ejakulatbefunde gewertet werden. Trotzdem besteht kein Zweifel daran, dass die Spermiogramm-Variablen eine zentrale

Bedeutung für die Fertilitätsbeurteilung haben. In Kohortenstudien ergaben sich sowohl signifikante Korrelationen zwischen Spermaqualität und Schwangerschaftsrate als auch Cut-off-Spermio-gramm-Werte zwischen fertilen und infertilen Männern. Es ist das Hauptproblem, dass für den einzelnen Patienten nicht mit der gleichen Sicherheit die Fertilität prognostiziert werden kann. Zwei Gründe sind dafür verantwortlich:

- (i) Wichtige Spermienfunktionen werden im Basis-Spermio-gramm nicht erfasst, z.B. Spermien-Oozyten-Interaktionen, Zervixmukuspene- tration sowie Spermien-DNA-Integrität.
- (ii) Kompensationsmechanismen durch die Partnerin bleiben unberücksichtigt. Demzufolge kann für den einzelnen Patienten die Fertilität nur grob prognostiziert werden.

Folgende Aussagen zum Spermio-gramm sind heute allgemein anerkannt:

1. Der Nachweis intakter motiler Spermien mit normaler Morphologie schließt absolute Zeugungsunfähigkeit aus.
2. Verschlechterung der Spermio-gramm-Variablen ist mit steigender Infertilitäts-Wahrscheinlichkeit assoziiert.
3. Die von der WHO empfohlenen Referenzwerte für ein normales Spermio-gramm (Tab. 3) sind nicht zwingende Cut-off-Werte zwischen fertilen und infertilen Männern.
4. Für den Individualfall kann die Fertilitätswahrscheinlichkeit nur in groben Bereichen angegeben werden.
5. Eine signifikante Verminderung der Fertilitätskapazität ist anzunehmen bei einer Spermienkonzentration < 5 Millionen/ml, einem Prozentanteil motiler Spermien unter 20 % und bei einem Prozentanteil normomorpher Spermien < 4 %.
6. Das Fertilisierungspotenzial sinkt dramatisch bei weniger als 0,9 Millionen motiler normomorpher Spermien pro Ejakulat; es ist
7. nahezu aufgehoben, wenn dieser Wert 30.000 unterschreitet.
8. Die endgültige Diagnosestellung sollte nicht ausschließlich anhand eines Spermio-grammes erfolgen. Es empfiehlt sich die Analyse von mindestens zwei Spermio-grammen idealerweise nach Beginn eines neuen Spermatogese-Zyklus (12 Wochen).

Literatur

1. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Arztlbl 2008; 105: A341–A355.
2. Haase G, Borg-von Zeppelin M, Bernhardt H et al: Pilzinfektionen Teil I – Allgemeine Aspekte, MiQ 14. Urban & Fischer, München 2001.
3. Haase G, Borg-von Zeppelin M, Bernhardt H et al: Pilzinfektionen Teil II – Spezielle Pilzdiagnostik, MiQ 15. Urban & Fischer, München 2001.
4. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd edn. Centraal bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands & Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, 2000.
5. Borelli C, Beifuss B, Borelli S, Schaller M, Korting HC. Konventionelle und molekulare Diagnostik bei Dermatomykosen. Hautarzt 2008; 59: 980–5.
6. Seebacher C, Brasch J, Abeck D, Cornely O, Effendy I, Ginter-Hanselmayer G, Haake N, Hamm G, Hipler UC, Hof H, Korting HC, Mayer P, Ruhnke M, Schlacke KH, Tietz HJ; German Society of Dermatology; German-speaking Mycological Society. Onychomycosis. Mycoses. 2007; 50: 321–7 (Onychomykose Leitlinie: www.dmykg.de oder www.awmf.de).
7. Meinhof W. Isolierung und Identifizierung von Dermatophyten. Zentralbl Bakteriologie 1990; 273: 229–245.
8. Nenoff P, Herrmann J, Gräser Y. Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale? Ein Dermatophyt im Wandel der Zeit. JDDG 2007; 5: 198–203.
9. Nenoff P. Schimmelpilze in der Dermatomykologie. Haut 2009; 4: 110–113.
10. Nenoff P, Mügge C, Hausteil UF. Differenzierung der wichtigsten fakultativ-pathogenen und apathogenen Sprosspilze. Teil I: Candida. Derm Praktische Dermatologie 2001; 4: 240–253.
11. Neumeister B, Geiss HK, R. Braun R, P. Kimmig P (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2009.
12. Nenoff P, Hillert R, Handrick W, Manos A, Krüger C, Herrmann J, Mayer P. Genitale Neisseria gonorrhoeae-Infektionen – aktuelle Aspekte zur Epidemiologie, Labordiagnostik, Resistenzsituation und Therapie. Derm Praktische Dermatologie 2010; 16: 16–37
13. World Health Organization. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th edition
14. Glander HJ, Haidl G, Kohn FM, Ochsendorf F, Paasch U, Schuppe HC. Andrology. J Dtsch Dermatol Ges 2007; 5: 924–933

Autoren:

Prof. Dr. med. Pietro Nenoff

Dr. med. Constanze Krüger

Laboratorium für medizinische Mikrobiologie, Mölbis

PD Dr. med. Sonja Grunewald,
Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Glander,
Prof. Dr. med. Uwe Paasch

Universitätsklinikum Leipzig, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Europäisches Ausbildungszentrum für Andrologie, Leipzig

Prof. Dr. med. Ralph M. Trüeb

Dermatologische Praxis und Haarcenter Professor Trüeb, Zentrum Wallisellen, CH-8303 Wallisellen, Schweiz

PD Dr. med. Kirsten Jung

Praxis für Dermatologie und Immunologie, Erfurt

Dr. med. Gudrun Hamm

Hautarztpraxis, Halle/Saale

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. med. Pietro Nenoff

Haut- und Laborarzt/Allergologie, Andrologie
Laboratorium für medizinische Mikrobiologie

Partnerschaft Dr. rer. nat. Jürgen Herrmann, Prof. Dr. med. Pietro Nenoff & Dr. med. Constanze Krüger
Straße des Friedens 8, D-04579 Mölbis
E-Mail nenoff@mykologie-experten.de