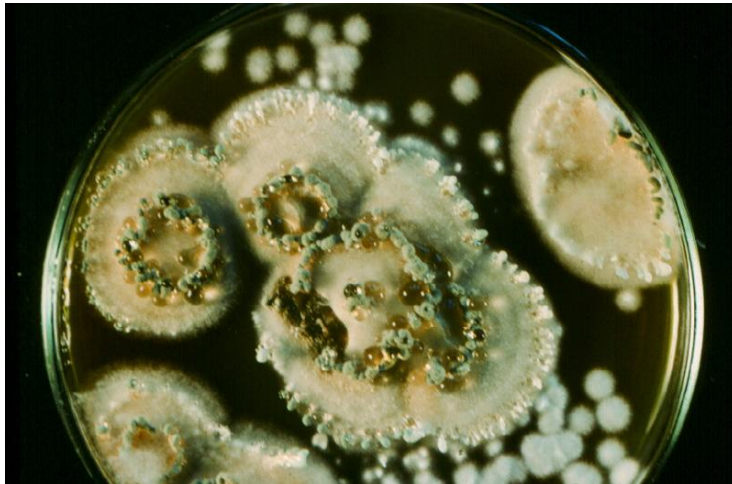


### 13. Arbeitstagung der Arbeitsgruppe „Mykologische Laboratoriumsdiagnostik“ innerhalb der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG)

Leipzig, 23. November 1999      Dorint-Hotel

Prof. Dr. Hans-Jürgen Tietz, Dr. Pietro Nenoff, Dr. Marie-Louise Kerkmann, Prof. Dr. Uwe-Frithjof Haustein



*Penicillium claviforme*  
Ausbildung von Koremien, Sabou-  
raud-4%-Glukose-Agar, 7 Tage  
alte Kolonie

#### *Malassezia furfur*

*Malassezia (M.) furfur* (frühere Bezeichnung *Pityrosporum ovale*) ist ein Spross- oder Hefepilz, der im Gegensatz zu den meisten anderen fakultativ-pathogenen Sprosspilzen der Gattung *Candida* zur normalen menschlichen Hautflora gerechnet wird. Dieser obligat-lipophile Sprosspilz wächst ausschließlich auf Kulturmedien, die langkettige Fettsäuren enthalten, welche als essentielles Substrat auf menschlicher Haut ebenfalls enthalten sind.

Neben *M. furfur* unterscheidet man noch die Spezies *M. pachydermatis*, eine nicht-lipophile Hefe, die in der Tiermedizin als Erreger einer Otitis externa beim Hund bekannt ist, jedoch auch als potentiell Pathogen bei abwehrgeschwächten Patienten beschrieben wird.

Die dritte, erst seit 1990 bekannte Art der Gattung *Malassezia* ist *M. sympodialis*, ein ebenfalls obligat lipophiler Pilz, der aus dem Ohr eines gesunden Individuums isoliert wurde und auf der Grundlage ultrastruktureller und genomischer Charakteristika als differente Spezies erkannt wurde.

In den letzten zwei oder drei Jahren wurde die botanische Gattung *Malassezia* aufgrund neu gefundener Merkmale der Morphologie, Physiologie, Ultrastruktur und Molekularbiologie einer gravierenden Veränderung bzw. Erweiterung unterzogen. Im Ergebnis davon vergrößerte sich die Gattung und beinhaltet derzeit sieben Spezies. Diese umfassen einerseits die drei bereits zuvor bekannten Taxa *M. furfur*, *M. pachydermatis* und *M. sympodialis*, und zusätzlich die Spezies *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* und *M. slooffiae* (Gueho et al. 1996). Mit Ausnahme von *M. pachydermatis* benötigen die übrigen Arten *in vitro* unbedingt die Supplementierung von langkettigen Fettsäuren im Medium, woraus der Ausdruck obligat-lipophiler Sprosspilz resultiert, der für die Mitglieder dieser Gattung verwendet wird.

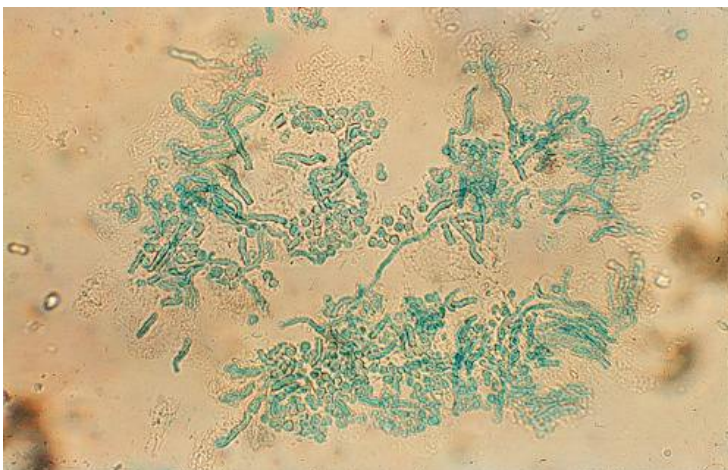
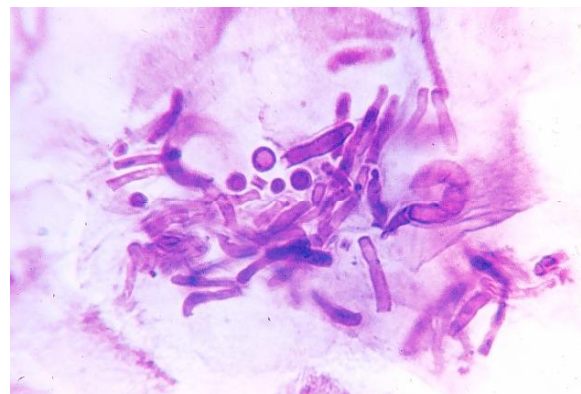
*M. furfur* lässt sich von nahezu allen erwachsenen Individuen kultivieren; wobei der Beginn der Kolonisierung während der Pubertät liegt, genau dann, wenn die Talgdrüsen aktiv werden. Trotzdem findet sich *M. furfur* auch gelegentlich auf der Haut von Kindern. Wahrscheinlich parallel mit dem Abfall des Hautlipidgehaltes sinkt mit zunehmendem Alter die Inzidenz von *M. furfur* auf der Haut. Die höchste Dichte von *M. furfur*-Sprosszellen weisen oberer Stamm, Nacken und Kopfhaut auf, alles Körperregionen mit einer großen Anzahl Talgdrüsen. *M. furfur* tritt in Hautläsionen und auf künstlichen Nährböden sowohl in der Hyphen-, als auch einer Sprosszellform auf. Auf normaler menschlicher Haut findet sich jedoch ausschließlich die Sprosszellphase.

*M. furfur* ist als auslösendes Agens mit einer Reihe vor allem dermatologischer Erkrankungen assoziiert. So gilt der lipophile Sprosspilz als Ursache der Pityriasis versicolor, der *Pityrosporum*- bzw. *Malassezia*-Follikulitis, daneben wurde eine *Malassezia*-Blepharitis beschrieben, und zunehmend treten auch systemische Infektionen durch *M. furfur* auf.

### Pityriasis versicolor



Pityriasis versicolor. Hyper- und hypopigmentierte Areale im Hautniveau. Beim Kratzen mit einem Holzspatel lassen sich kleine, kleieartige Hautschuppen loslösen (Hobelspanphänomen).



*Malassezia furfur* bei Pityriasis versicolor. Mikroskopisches Bild der in Haufen angeordneten runden Pilzelemente gemeinsam mit relativ kurzen, wenig septierten, z. T. halbmondformig gekrümmten Hyphenstücken im Kalilauge-Präparat + Parkertinte (links) aus Hautschuppen. Oben: Färbung: Kresylechtrot.

Erst kürzlich gelang Mayser & Wille (1998) der Nachweis, dass *M. furfur* in der Lage ist, aus Tryptophan als Stickstoffquelle Pigmente und Fluorochrome zu bilden, was möglicherweise pathogenetische Bedeutung für die Pityriasis versicolor besitzt. So haben Mayser & Pape (1998) in einer weiteren Untersuchung den protektiven Effekt dieses aus Tryptophan produzierten Farbstoffes gegenüber ultraviolettem Licht gezeigt. Im Gegensatz dazu ist die Spezies *M. sympodialis* nicht fähig, Pigmente auszubilden und weist gegenüber UV-Licht keine unterschiedliche Resistenz oder Empfindlichkeit auf, wie man es für *M. furfur* in Abhängigkeit vom angebotenen Substrat (Arginin oder Tryptophan als Stickstoffquelle) sehen kann.

### **Malassezia-Follikulitis**

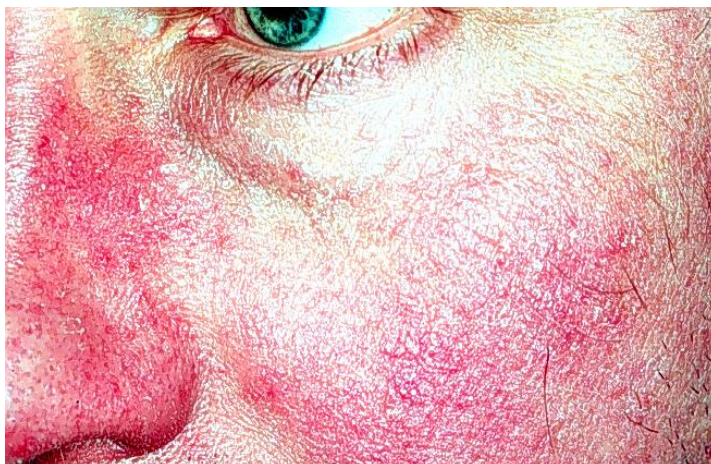
Eine weitere *M. furfur*-assoziierte Dermatose ist die erstmals 1968 von Weary beschriebene *Pityrosporum*-Follikulitis (= *Malassezia*-Follikulitis). Es handelt sich dabei um gerötete papulopustulöse Effloreszenzen, die fast nur immunsupprimierte Patienten betreffen. Disponierende Erkrankungen sind u. a. Diabetes mellitus, chronische Nierenerkrankungen, Knochenmarkstransplantation sowie Antibiotika- und Glukokortikoidtherapie. In erster Linie finden sich die Läsionen der *Malassezia*-Follikulitis am Stamm (Brust, Rücken), außerdem im Oberarm, Schulter- und Nackenbereich. Im Gegensatz zur Akne findet sich die *Malassezia*-Follikulitis nicht bei Adoleszenten und ist außerdem durch ausgeprägten Juckreiz gekennzeichnet. In den entzündlichen Follikeln lässt sich eine große Zahl länglicher, ovaler, sprossender Hefezellen nachweisen, nur selten auch einmal ein hyphenartiges Pilzelement.

### **Systemmykosen durch *Malassezia furfur***

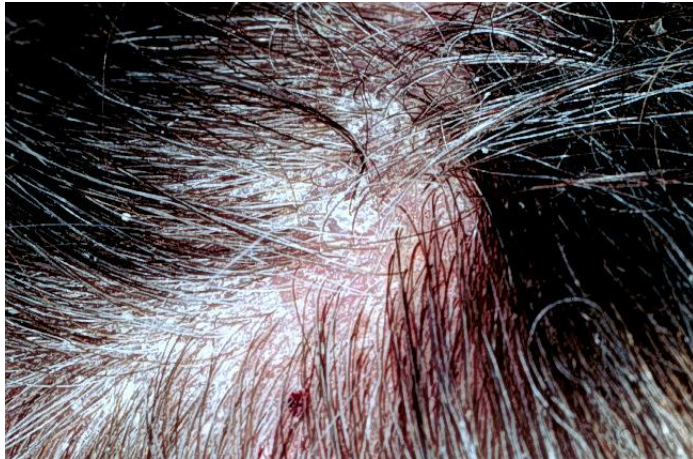
Mittlerweile gibt es eine Reihe Mitteilungen über systemische Infektionen durch *M. furfur* und außerdem *M. pachydermatis* in Form der Katheter-assoziierten Sepsis. Erstmals wurde dieses Krankheitsbild 1981 bei einem unreifen Neugeborenen unter einer Therapie mit Intralipid beschreiben. Man kann die Patienten in zwei Gruppen einteilen: 1) gewöhnlich unreife Neugeborene bei diversen kongenitalen Erkrankungen, die über einen zentralen Venenkatheter total parenteral ernährt werden und 2) immunsupprimierte Erwachsene, die ebenfalls total parenteral ernährt werden, speziell mit Fettemulsionen.

### **Seborrhoisches Ekzem und Kopfschuppung**

Das seborrhoische Ekzem (SE) ist definiert als eine chronisch entzündliche Erkrankung der Haut, die prinzipiell die seborrhoischen Areale betrifft. Das sind hauptsächlich die behaarte Kopfhaut, das Gesicht mit den nasolabialen Falten, die retroaurikulären Regionen, Gehörgänge, Stirn und der obere Stamm mit vorderer und hinterer Schweißrinne.



Seborrhoisches Ekzem: Erythem und Schuppung (+Juckreiz) in den seborrhoischen Arealen des Gesichts bei einem AIDS-Patienten.



Kopfschuppen als Ausdruck eines milden seborrhoischen Ekzems.

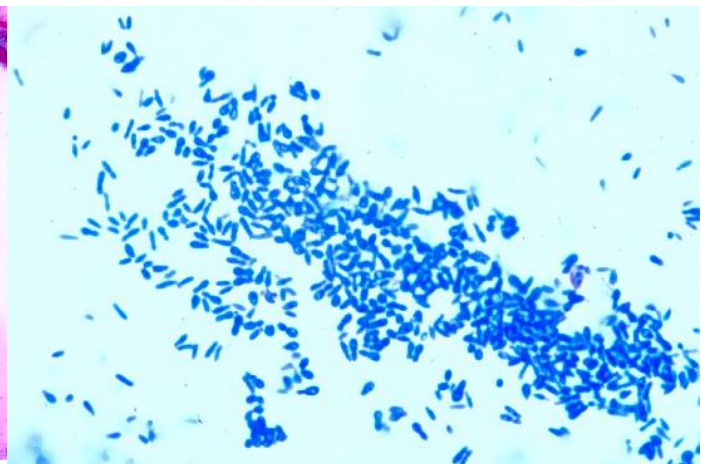
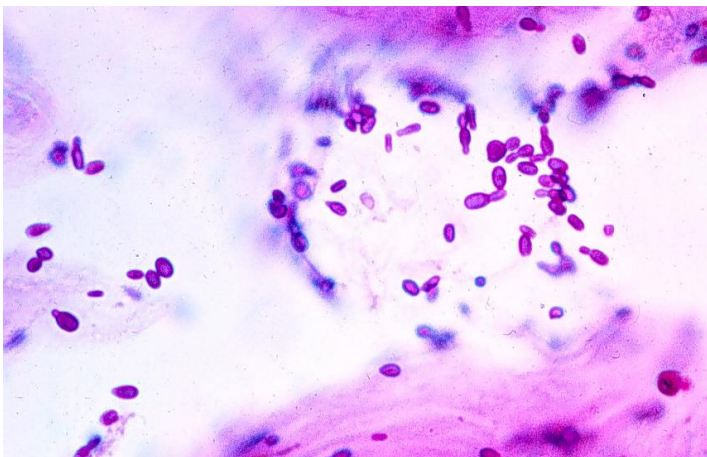


*Malassezia furfur.*

Kleine, teils glatte, teils rauhe Kolonien mit unregelmäßiger Begrenzung. Wachstum bei 37°C auf Sabouraud-4%-Glukose-Agar mit 2% Olivenöl und 0,2% Tween 80.

*Malassezia furfur.*

Ausstrich von der Kultur mit dem Nachweis von sehr kleinen, flaschenförmigen, z. T. ballonartig aufgetriebenen, charakteristischen Sprosszellen. Methylenblaufärbung.



Diese Dermatose zeichnet sich durch Erythem, Juckreiz und Schuppung der Haut aus. Sie kann, muss jedoch nicht, mit Seborrhoeae und Haarausfall assoziiert sein.

Das SE hat eine deutlich höhere Prävalenz bei Patienten mit HIV-Infektion, nicht selten ist ein

SE auch der erste klinische Hinweis auf das Vorliegen von AIDS.

Andererseits setzt sich jedoch mehr und mehr die Meinung durch, dass Kopfschuppen ein frühes Stadium bzw. eine milde Form des SE darstellen.

### **Seborrhoisches Ekzem und *Malassezia furfur***

Sowohl das SE, als auch Kopfschuppen sind eng mit dem Vorhandensein des lipophilen Sprosspilzes *M. furfur* assoziiert. Obwohl der exakte Mechanismus noch nicht eindeutig nachgewiesen ist, wird die pathogenetische Bedeutung von *M. furfur* für diese Hauterkrankung mehr und mehr akzeptiert.

Der erfolgreiche Einsatz von Antimykotika, speziell Ketoconazol, für die Behandlung des SE und der Kopfschuppen unterstreicht die Hypothese, dass *M. furfur* ätiologisch bedeutsam für diese Hauterkrankungen ist. Der therapeutische Effekt von antimykotischen Substanzen bei diesen Dermatosen beruht wahrscheinlich auf einer Wachstumshemmung von *M. furfur in vivo*.

### **Kulturelle Anzucht von *Malassezia* spp.**

#### *M. furfur*-Stämme

aus Hautschuppen von Patienten mit seborrhoischem Ekzem  
Kopfschuppen (Pityriasis capitis)  
Hautschuppen bei Pityriasis versicolor  
(aus Blutkulturen, Katheterspitzen, etc.  
bei Verdacht auf Systemmykose durch *Malassezia* spp.)

Um das Wachstum der lipophilen Hefe zu gewährleisten, erfolgt die primäre kulturelle Anzucht und weitere Subkultivierung

auf Sabouraud-4% Glukose-Nährboden (z. B. SIFIN, Berlin; pH 5,7)

+ 2% Olivenöl

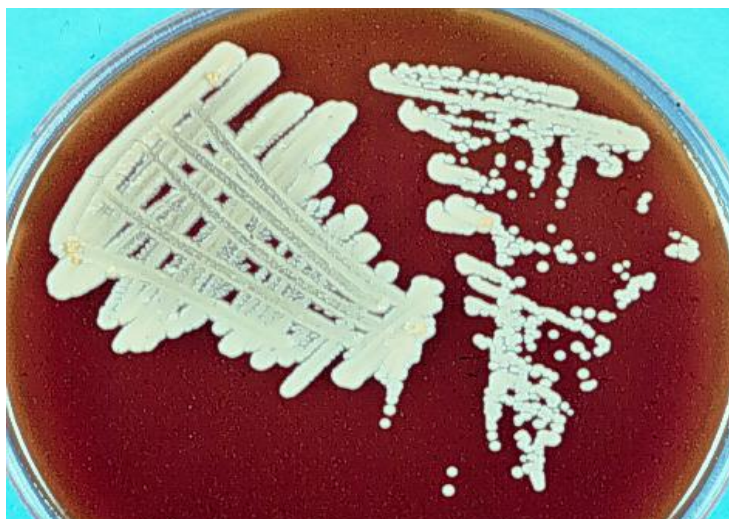
+ 0,2% Tween 80 (beides nach dem Autoklavieren zugeben!)

**bei 37°C**

Inkubation für 10-14 Tage

Ein Pilzisolat wird als der Spezies *M. furfur* zugehörig erkannt, wenn es obligat-lipophil ist und wenn die mikroskopisch erkennbaren Merkmale mit der Mikromorphologie, wie bei Yarrow & Ahearn beschrieben, übereinstimmen (Yarrow & Ahearn 1988).

### **Dixon-Agar zur Anzucht von *Malassezia* spp.**



#### *Malassezia furfur*.

Kleine, teils glatte, teils rauhe Kolonien mit unregelmäßiger Begrenzung. Wachstum bei 37°C auf Dixon-Agar.

Dixon-Agar (Van Abbe 1964, Leeming & Notman 1987) zur Kultivierung hat den Vorteil, dass auf den Zusatz von Olivenöl und Tween 80 zum Nährboden verzichtet werden kann. Anstelle dessen wird dem Nährboden als Wachstumssubstrat für *M. furfur* Glycerolmonooleat beigemischt. Als Modifikation kann anstelle von Glycerolmonooleat Glycerolmonostearat verwendet werden.

Dadurch lässt sich im Nachhinein eine homogene, ölfreie Keimsuspension der *Malassezia*-Sprosszellen in physiologischer Kochsalzlösung bereiten.

### Dixon-Agar

Dixon-Agar (H. Dixon's Formula) wird in Anlehnung an Van Abbe (1964) und Leeming & Notman (1987) in modifizierter Form hergestellt:

Malzextraktagar	(Oxoid/Unipath, Basingstoke, Hampshire, England)	6%
Ochsengalle	(Oxoid/Unipath, Basingstoke, Hampshire, England)	2%
Tween 40	(Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)	1%
Glycerolmonostearat	(Vaselinefabrik Wasserfuhr GmbH, Bonn)	0,25%
Streptomycinsulfat	(Grünenthal GmbH, Stolberg)	40 µg ml <sup>-1</sup>
Cycloheximid	(Ferak, Berlin)	250 µg ml <sup>-1</sup>
Destilliertes Wasser		ad 100%

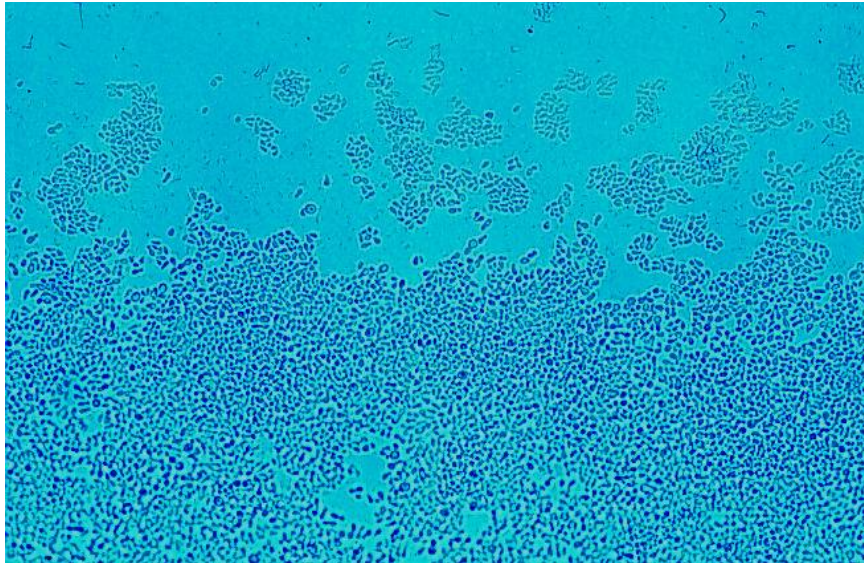
Um einen Liter des Mediums herzustellen, werden 60 g Malzextraktagar und 20 g getrocknete Ochsengalle mit destilliertem Wasser unter Erwärmung und Rühren vermengt. Nach vollständiger Lösung der Bestandteile werden 10 ml Tween 40 und 2,5 ml Glycerolmonostearat hinzugefügt sowie 15 g Bacto-Agar, auf einen Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt und danach autoklaviert.

### *Malassezia pachydermatis*

#### *Malassezia pachydermatis*.

Kleine, teils glatte, teils rauhe, beige Kolonien mit unregelmäßiger Begrenzung. Wachstum bei 37°C auf Sabouraud-4%-Glukose-Agar ohne Zusätze.





*Malassezia pachydermatis*.  
Auf Reis-Agar sieht man auffällig kleine, typisch länglich bzw. ballonförmig aufgetriebene Sprosszellen.

### ***In vitro*-Empfindlichkeit von Sprosspilzen gegenüber Fluconazol und Itraconazol**

*Candida albicans* und andere *Candida*-Arten verursachen Mykosen der Haut, seltener der Nägel, darüber hinaus sind sie als opportunistische Erreger verantwortlich für Infektionen der Schleimhäute und für systemische oder tiefe Kandidosen.



Soor der Mundschleimhaut und Zunge durch *Candida albicans*.

Pfaller et al. (1998) berichteten erst kürzlich, dass sich *Candida* spp. mit 8% an vierter Stelle nach koagulase-negativen Staphylokokken (32,3%), *Staphylococcus aureus* (16,7%) und *Enterococcus* spp. (11,7%) unter den zehn häufigsten Erregern von nosokomialen Blutstrominfektionen in den USA fanden (SCOPE Surveillance Program, April 1995 - Juni 1996). Therapie der Wahl für eine systemische Kandidose ist nach wie vor Amphotericin B, in der Regel kombiniert mit 5-Flucytosin. Neuerdings steht neben dem konventionellen Amphotericin B auch liposomal verkapseltes Amphotericin B zur Verfügung. Bei gleicher Wirksamkeit

treten deutlich weniger der für dieses Polyenantimykotikum gefürchteten Nebenwirkungen, u. a. Nierenschädigung, auf.

Das nephro- und myelotoxische 5-Flucytosin, das nicht alle Erreger erfasst, weist zudem primäre und sekundäre Resistenzen gegen *Candida*- und *Aspergillus*-Arten auf.

Große Hoffnungen richten sich auf die modernen Triazolderivate Fluconazol und Itraconazol. Diese haben seit Anfang der neunziger Jahre einen festen Platz in der Prophylaxe und Therapie von superfiziellen und tiefen Mykosen bei immunsupprimierten Patienten.

Im Gegensatz zu Amphotericin B, einem Polyenantimykotikum, für welches eine Resistenzentwicklung extrem selten ist, werden seit 1991 mehr und mehr Berichte publiziert, ein Therapieversagen und die Resistenz gegen Fluconazol betreffend. Ob ein Therapieversagen jedoch durch einen hohen oder angestiegenen Fluconazol-MHK-Wert (MHK = minimale Hemmkonzentration) des die Infektion verursachenden *Candida*-Isolates verursacht ist, lässt sich dann schlüssig sagen, wenn die Empfindlichkeit des Pilzstammes bestimmt worden ist.

Neben Fluconazol ist auch Itraconazol in den letzten Jahren im großen Umfang für die Behandlung von schweren *Candida*-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten eingesetzt worden.

Die Wirkungsweise der Azole beruht auf einer Hemmung des Zytochrom-P450-Enzymsystems (CYP51), welches verantwortlich zeichnet für die 14- $\alpha$ -Demethylierung von Lanosterol bei dem Sprosspilz *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe), bzw. von 24-Methylendihydrolanosterol bei den meisten anderen Pilzen, eingeschlossen die als Hauptpathogen für den Menschen fungierende *C. albicans*.

Drei Mechanismen der Azolresistenz sind bisher nachgewiesen worden. Das sind 1) eine reduzierte intrazelluläre Arzneimittelakkumulierung, resultierend entweder aus einer reduzierten Aufnahme des Wirkstoffes, oder aus einer gesteigerten Wirkstoffabgabe als Folge der Wirkung von Genprodukten der sog. multidrug resistance genes, 2) strukturelle Veränderungen des 14- $\alpha$ -Demethylaseenzym mit daraus resultierender verminderter Azolbindung, und 3) Überproduktion dieses Zielenzym infolge von Genamplifikationen.

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen der Azolantimykotika gegenüber *C. albicans* und anderen Sprosspilzspezies ist durchaus problematisch, nicht zuletzt aufgrund der bis zum heutigen Tag noch nicht verbindlich geregelten Standardisierung der Labormethoden zur *In vitro*-Empfindlichkeitstestung von Sprosspilzen.

Vom Juni 1997 stammt der jetzt nicht mehr nur vorgeschlagene, sondern vorerst auch gebilligte Standard für eine Referenzmethode (M27-A) für eine Bouillonverdünnungstechnik der antimykotischen Empfindlichkeitstestung von Sprosspilzen des National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing). Für diese sowohl als Makro- und auch Mikrobouillonverdünnungsmethode durchführbare Technik kommt RPMI-1640-Medium, welches 0,165 M MOPS (Morpholinpropansulfonsäure; pH 7,0) enthält, zum Einsatz.

Das Sprozzellinokulum umfasst 0,5 bis 2,5 x 10<sup>3</sup> KbE, die Inkubationstemperatur beträgt 36°C, und die Inkubationszeit 48 Stunden für *Candida*-Spezies. Diese Methode wurde nicht nur für die Testung der Azole, wie Ketoconazol, Fluconazol und Itraconazol, sondern auch für Amphotericin B und 5-Flucytosin vorgeschlagen.

Andererseits wurde ein Vorschlag für eine standardisierte Mikrodilutionsmethode unter Einsatz des semisynthetischen HR (high resolution, Unipath/Oxoid, CM 845) entwickelt und publiziert, basierend auf einer Multizenterstudie der Arbeitsgruppe Klinische Mykologie der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (Schmalreck & Fegeler 1996, Schmalreck et al. 1995).



Im Gegensatz zu der oben erwähnten NCCLS-Methode wird HR-Medium, supplementiert mit Glukose und Asparagin, jedoch ohne Natriumhydrogencarbonat verwendet. Das Medium wird in einem 0,2 M Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Puffer, pH 7,0, aufgelöst. Die Endpunkte werden nach 18 (-24) Stunden Inkubationszeit abgelesen, oder später, falls die Wachstumskontrolle noch kein sichtbares Wachstum zeigte, in der Regel nach 48 Stunden. Diese Mikrodilutionsmethode stimmt überein mit dem im August 1999 erschienenen Norm-Entwurf für die standardisierte Sprosspilzempfindlichkeitstestung des DIN Deutsches Institut für Normung e. V. (Berlin).

### Kultivierung der Sprosspilzstämmen



Die Anzucht der Patientenproben und auch die Kultivierung der Referenzstämmen erfolgt auf Sabouraud 4%-Glukose-Agar (SIFIN, Berlin, pH 6,9). Die Isolate werden ebenfalls auf Sabouraud 4%-Glukose-Agar bei Raumtemperatur aufbewahrt bis zum Beginn der Untersuchungen.

### Kontrollen

Mindestens einen Kontrollstamm (ATCC-Referenzstamm) pro Testung mitführen.

Sprosspilz	Nummer	MHK Itraconazol	MHK Fluconazol
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 90030	0,06-0,25	4,0-16,0
<i>Issatchenkia orientalis</i>	ATCC 6258	0,125-0,5	16,0-64,0
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	0,06-0,25	0,5-2,0

## ***In vitro*-Empfindlichkeitstestung**

### **Kulturmedium**

#### **HR-Medium**

Herstellung des HR (high resolution)-Mediums (Unipath/Oxoid CM 845) unter Zusatz von Glukose (2%) und Asparagin (0,1%) aber ohne Verwendung von Natriumbicarbonat. Zusammensetzung aus zwei Teilen:

Teil A: Phosphatpuffer, bestehend aus zwei Pufferlösungen

Pufferlösung 1: 35,60 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Nr. 6580) pro 1 l dest. Wasser

Pufferlösung 2: 27,22 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt, Nr. 4873) pro 1 l dest. Wasser

Mischen von 700 ml Puffer 1 und 300 ml Puffer 2 ergibt einen Liter 0,2 molaren Phosphatpuffer, pH 7,0. Anschließend autoklavieren bei 121°C.

Teil B: Bestehend aus 29,34 g HR-Medium, gelöst in 900 ml dest. Wasser. Darin Lösen von 20 g Glucose (Endkonzentration 2%). Den 900 ml HR-Medium 2,0 g Asparagin, gelöst in 100 ml dest. Wasser, zusetzen.

Sterilfiltration dieser Lösung über einen 0,2 m-Membranfilter (Corning Glass Works, Corning, USA). Aufbewahrung bei 4°C für 2-4 Wochen möglich.

Für die Mikrodilution mischt man Teil A und B im Verhältnis 1:1.

#### **HR-Medium mit Methylenblau**

Herstellung des Mediums wie oben beschrieben mit anschließendem Zusatz von 0,25 mg Methylenblau pro Liter.

z. B. folgendermaßen: 0,1 g Methylenblau auf 20 ml aqua dest. = 0,25 mg/l

10 µl dieser Stammlösung auf 100 ml Puffer + 100 ml HR-Medium

#### **Mikrodilutionstechnik**

Die Empfindlichkeitstestung mittels Mikrodilution wird entsprechend der von Schmalreck & Fegeler (1996) publizierten Beschreibung durchgeführt. Diese Durchführung der *In vitro*-Empfindlichkeitstestung von Sprossspitzen gegenüber Fluconazol entspricht den Empfehlungen der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, wie sie auf der 29. Konferenz der Arbeitsgruppe Klinische Mykologie, 14./15. Februar 1997, in Berlin festgelegt wurden, bzw. dem aktuell im August 1999 vorgelegten DIN-Vorschlag.

#### **Antimykotika**

Reinsubstanzen verwenden. Als Lösungsmittel für Fluconazol (Pfizer, Karlsruhe) Methanol, für Itraconazol Itraconazol (Janssen-Cilag, Neuss) Dimethylsulfoxid.

Folgende Verdünnungsreihen:

**Fluconazol** - 5,12 mg gelöst in 2 ml Methanol; verdünnt mit 18 ml dest. Wasser; entspricht einer Stammlösung von 256 µg/ml (doppelt konzentriert).

**Itraconazol** - 5,12 mg gelöst in 2 ml Dimethylsulfoxid; verdünnt mit 18 ml dest. Wasser = Stammlösung; **weitere Verdünnung mit HR-Medium.**

5 ml der Stammlösung + 15 ml HR-Medium

davon 5 ml + 15 ml HR-Medium

davon wiederum 5 ml + 15 ml HR-Medium = 4 µg ml<sup>-1</sup> = in Vertiefung Nr. 1 und 2

Die jeweilige Wirkstoffkonzentration liegt als **doppelt** konzentrierte Lösung mit einem Volumen von 100 µl je Vertiefung vor. (100 µl Wirkstofflösung + 100 µl Inokulum = 200 µl Endvolumen).

Vorgefertigte Testbehältnisse mit Wirkstofflösung können, wenn der Test nicht sofort durchgeführt wird, bei -20°C abgedeckt aufbewahrt werden.

### **Inokulum**

Prinzipiell existieren 2 Möglichkeiten der Inokulumherstellung:

**I.** Die zu testenden Sprosspilzisolat werden zunächst auf Sabouraud 4%-Glukoseagar auf Petrischalen für 48 h bei 26°C kultiviert. Danach erfolgte die Zubereitung der Sprosspilzsuspensionen, indem die Kolonien des jeweiligen Stammes von der Agaroberfläche mit 2 ml flüssigem HR-Medium abgespült werden. Diese Suspension wird weiter mit HR-Medium in mehreren Schritten verdünnt, bis die letztlich einzusetzenden Sprosszellichten von 0,5 bis  $2,5 \times 10^2$  und  $10^3$  KbE pro ml erreicht sind. In jedem Fall wird die Inokulumdichte überprüft durch Austreichen der Keimsuspension auf Sabouraud 4%-Glukoseagarplatten und nachfolgendem Zählen der gewachsenen Kolonien. Z. B. 50 µl von  $10^3$  KbE pro ml auf der Petrischale ausspateln, nach zwei Tagen auszählen, die Keimzahl ergibt sich aus der Multiplikation mit 2 und mit 10 = KbE pro 1 ml. Außerdem lässt sich die richtige Keimdichte durch Auszählen der Sprosszellen in einer Neubauer-Zählkammer verifizieren.

### **II. McFarland-Standard**

Aus einer frischen Reinkultur Keimdichte auf McFarland - Standard 0,5 (bis 1), entsprechend einer Konzentration von ungefähr  $1 - 5 \cdot 10^6$ , einstellen. Davon 10 µl in 10 ml Medium ergibt eine Konzentration von 0,5 bis  $2,5 \cdot 10^3$  KbE/ml. Davon wiederum 1 ml in 9 ml HR-Medium =  $10^2$  KbE/ml. Beim Pipettieren zuerst die Vertiefungen mit  $10^2$  beschicken, danach mit der selben Pipette die  $10^3$ /ml.

Von der Herstellung des Inokulums bis zum Beschicken der Titerplatten dürfen nicht mehr als 20 min vergehen.

### ***In vitro*-Empfindlichkeitstestung**

#### **Beimpfen der Testplatten**

Sterile, polysterene, Flachboden-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Greiner, Frickenhausen) verwenden.

Die Beimpfung der Platten folgendermaßen:

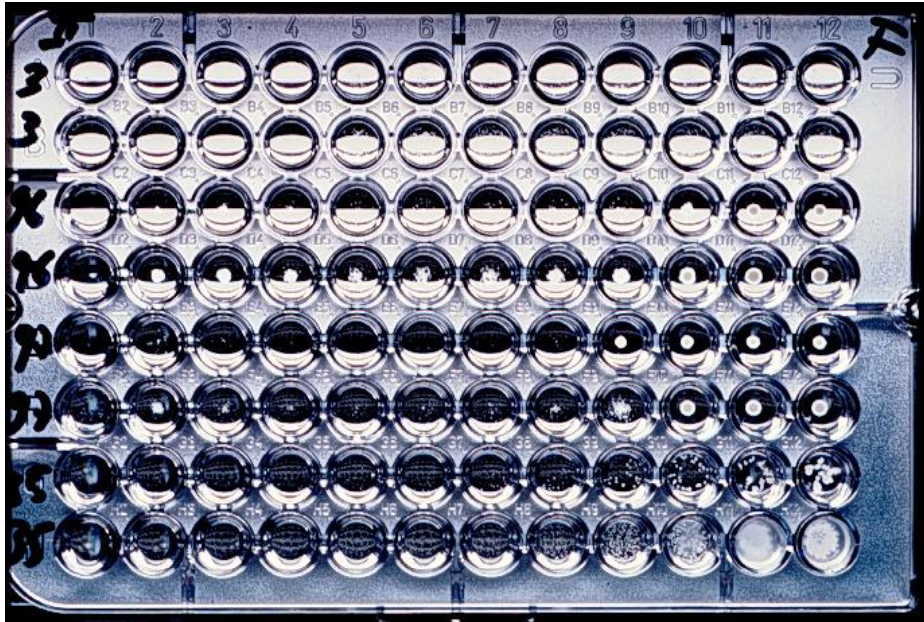
- je 100 µl HR-Medium in Vertiefungen 2 - 11 der Titerplatte (unter Einsatz einer Achtkanalpipette)
- je 100 µl Antimykotikum (Stammlösung) in Vertiefung 1 und 2
- Herstellen der Verdünnungsreihe (z. B. mit Achtkanalpipette) durch fortlaufendes Abnehmen von 100 µl, beginnend bei Spalte 2, einfüllen in die nächste Spalte (3) und mischen; angekommen bei Spalte 11 verwerfen der 100 µl; kein Antimykotikum in Spalte 12 (= Wachstumskontrolle)
- (An dieser Stelle können die Titerplatten abgedeckt eingefroren werden)
- 100 µl Inokulum in jede Vertiefung
- Gesamtvolumen pro Vertiefung = 200 µl
- Abdecken der Platten als Schutz vor Kontamination z. B. mit Parafilm

Die Wirkstoffkonzentrationen liegen in einem Bereich von 0,125 bis 128 µg ml<sup>-1</sup> für Fluconazol und 0,002 bis 2 µg ml<sup>-1</sup> für Itraconazol. Die Mikrotiterplatten werden mit Parafilm abgedeckt, um eine Volumenänderung durch Verdunstung zu vermeiden. Die Inkubationszeit beträgt 18 (-24) Stunden bei 36°C ± 1°C. Die MHK-Werte werden noch ein zweites Mal nach 48 Stunden Inkubation abgelesen.

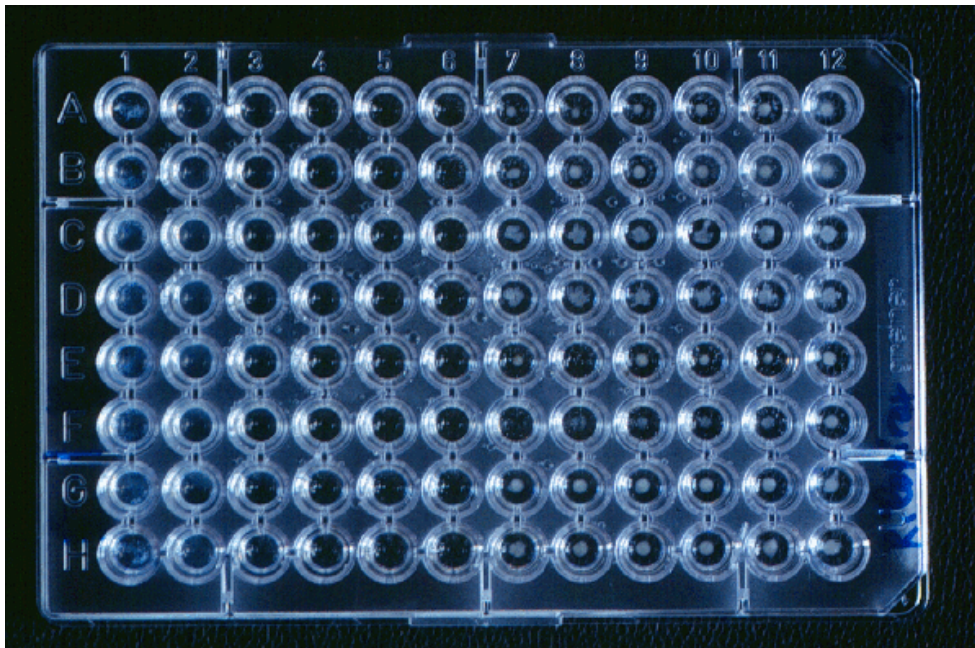
Nur wenige langsam wachsende Sprosspilzspezies werden für 72 oder sogar 96 Stunden inkubiert, bevor der Endpunkt klar abgelesen werden konnte und außerdem die Wachstumskontrolle ausreichend gewachsen war. Die Endpunkte werden visuell mit dem bloßen Auge abgelesen, und der MHK-Wert war definiert als die niedrigste Antimykotikumkonzentration, bei der eine Hemmung des Sprosszellwachstums erfolgte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hefe 1 10 <sup>2</sup> ml <sup>-1</sup>	FLU 128	FLU 64	FLU 32	FLU 16	FLU 8	FLU 4	FLU 2	FLU 1	FLU 0,5	FLU 0,25	FLU 0,125	WK 0
Hefe 1 10 <sup>3</sup> ml <sup>-1</sup>	FLU 128	FLU 64	FLU 32	FLU 16	FLU 8	FLU 4	FLU 2	FLU 1	FLU 0,5	FLU 0,25	FLU 0,125	WK 0
Hefe 1 10 <sup>2</sup> ml <sup>-1</sup>	ITR 2	ITR 1	ITR 0,5	ITR 0,25	ITR 0,125	ITR 0,062	ITR 0,031	ITR 0,016	ITR 0,008	ITR 0,004	ITR 0,002	WK 0
Hefe 1 10 <sup>3</sup> ml <sup>-1</sup>	ITR 2	ITR 1	ITR 0,5	ITR 0,25	ITR 0,125	ITR 0,062	ITR 0,031	ITR 0,016	ITR 0,008	ITR 0,004	ITR 0,002	WK 0
Hefe 2 10 <sup>2</sup> ml <sup>-1</sup>	FLU 128	FLU 64	FLU 32	FLU 16	FLU 8	FLU 4	FLU 2	FLU 1	FLU 0,5	FLU 0,25	FLU 0,125	WK 0
Hefe 2 10 <sup>3</sup> ml <sup>-1</sup>	FLU 128	FLU 64	FLU 32	FLU 16	FLU 8	FLU 4	FLU 2	FLU 1	FLU 0,5	FLU 0,25	FLU 0,125	WK 0
Hefe 2 10 <sup>2</sup> ml <sup>-1</sup>	ITR 2	ITR 1	ITR 0,5	ITR 0,25	ITR 0,125	ITR 0,062	ITR 0,031	ITR 0,016	ITR 0,008	ITR 0,004	ITR 0,002	WK 0
Hefe 2 10 <sup>3</sup> ml <sup>-1</sup>	ITR 2	ITR 1	ITR 0,5	ITR 0,25	ITR 0,125	ITR 0,062	ITR 0,031	ITR 0,016	ITR 0,008	ITR 0,004	ITR 0,002	WK 0

Schema einer Titerplatte mit Antimykotikum und entsprechender Verdünnungsreihe (Konzentration in FLU=Fluconazol, ITR=Itraconazol, WK=Wachstumskontrolle)



Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration mittels Mikrodilution. Antimykotikum: Fluconazol.



Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration mittels Mikrodilution. Antimykotikum: Rilopirox.

### Endpunktbestimmung

- Visuell (evtl. mit Hilfe eines Spiegels) im Vergleich zur Wachstumskontrolle. MHK = die Konzentration der ersten nicht bewachsenen Verdünnungsstufe. Bei nicht eindeutig ablesbarem Endpunkt folgenden numerischer Score anwenden: 0 - optisch klar, 1 - leicht trüb (>10 Einzelkolonien), 2 - deutliche Reduktion der Trübung (= 80% Wachstumsreduktion = MHK), 3 - geringe Reduktion der Trübung (50% Wachstumsreduktion) und 4 - keine Reduktion der Trübung im Vergleich zur Wachstumskontrolle.
- photometrisch bei 530 - 620 nm. MHK = IC80

Ein Grenzwert für die Fluconazolresistenz (und die von Itraconazol) wurde bisher noch nicht allgemeinverbindlich festgelegt. Folgende Vorschläge existieren:

### Grenzwertvorschläge des NCCLS

(breakpoint proposals of the NCCLS subcommittee on antifungal susceptibility testing [Appendix C: interpretive guidelines for susceptibility testing *in vitro* of *Candida* species. NCCLS Vol. 17, No. 9, 1997])

#### Fluconazol

MHK-Werte

$\geq 64 \mu\text{g ml}^{-1}$	<i>In vitro</i> -Resistenz gegen Fluconazol	(resistant)
$16\text{-}32 \mu\text{g ml}^{-1}$	dosisabhängig empfindlich	(susceptible-dose dependent)
$\leq 8 \mu\text{g ml}^{-1}$	Empfindlichkeit gegen Fluconazol	(susceptible)

#### Itraconazol

MHK-Werte

$\geq 1 \mu\text{g ml}^{-1}$	<i>In vitro</i> -Resistenz gegen Itraconazol	(resistant)
$0,25\text{-}0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$	dosisabhängig empfindlich	(susceptible-dose dependent)
$\leq 0,125 \mu\text{g ml}^{-1}$	Empfindlichkeit gegen Itraconazol	(susceptible)

### Grenzwertvorschläge laut DmykG

(Schmalreck A-F, & Fegeler W (1996) Kriterien zur Empfindlichkeitsprüfung von Fluconazol im Mikrodilutionstest: Vorschlag für eine standardisierte Methode zur Testung von Sprosspilzen. *mycoses* 39 (Suppl. 2), 12-16)

#### Fluconazol

MHK-Werte

$\geq 32 \mu\text{g ml}^{-1}$	<i>In vitro</i> -Resistenz gegen Fluconazol	(resistant)
$8\text{-}16 \mu\text{g ml}^{-1}$	dosisabhängig empfindlich	(susceptible-dose dependent)
$\leq 4 \mu\text{g ml}^{-1}$	Empfindlichkeit gegen Fluconazol	(susceptible)

## ***In vitro*-Empfindlichkeit von Dermatophyten gegenüber Azolantimykotika, Griseofulvin und Terbinafin**



*Microsporum canis*

Die Dermatophyten spielen in bezug auf das Vorhandensein einer primären bzw. der Entwicklung einer sekundären Resistenz gegenüber Antimykotika, so ist die überwiegende Meinung, keine Rolle. Dem steht jedoch entgegen, dass trotzdem die Behandlung bestimmter Dermatophytosen schwierig ist, und speziell bei der Tinea unguium bzw. Onychomykose nicht in jedem Fall erfolgreich abgeschlossen wird. Ein weiteres Problemfeld sind die meist kindlichen oder jugendlichen Patienten mit Tineas capitis, hierbei besonders mit dem zoophilen Hautpilz *Microsporum canis* als Erreger.

In den letzten zehn Jahren sind verschiedene neue, in klinischen Studien erprobte und gegen Dermatophyten wirksame Antimykotika eingeführt worden. Nicht zuletzt die Therapie von Nagelpilzinfektionen, den Onychomykosen, die über Jahrzehnte nur sehr unzureichend mit dem seit 1959 eingeführten Griseofulvin behandelt wurden, hat davon profitiert. Zu nennen sind neben dem Triazol Itraconazol, vor allem das *in vitro* sehr aktive Allylamin Terbinafin. Der pharmakologische Wirkmechanismus von Terbinafin und Itraconazol beruht auf einer Störung der Synthese von Ergosterol in der Pilzzellwand. Itraconazol, und auch alle anderen Azole, binden sich an das Zytochrom P450-abhängige Enzym 14- $\alpha$ -Demethylase und hemmen die Bildung von Ergosterol aus Lanosterol. Terbinafin dagegen greift bereits früher in die Ergosterolsynthese ein, indem die Squalenepoxidase spezifisch gehemmt wird. Es ist damit zu rechnen, dass ca. 70% der Patienten mit Onychomykose durch diese Antimykotika geheilt werden können. Neuerdings ist auch Fluconazol zur Therapie von Dermatophyteninfektionen zugelassen und wird zunehmend dafür eingesetzt. Erste Berichte über den Einsatz dieses Azols auch für die Behandlung der Tinea unguium - einmal pro Woche 150 mg Fluconazol über mindestens ein halbes Jahr - wurden mitgeteilt, wobei für diese Indikation die Zulassung des Wirkstoffes noch nicht vorliegt. Bisher ging man überwiegend davon aus, dass Dermatophyten *in vitro* generell empfindlich gegenüber den Antimykotika sind. Nur sehr sporadisch wurde in den letzten Jahrzehnten über gegenüber Griseofulvin resistente Dermatophytenstämme berichtet.

### ***In vitro*-Empfindlichkeitstestung von Dermatophyten**

Die MHK-Werte werden mittels Agardilutionsmethode unter Einsatz von D.S.T.-Agar (Unipath Ltd., Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England; pH 5,7) ermittelt. Folgende Antimykoti-

ka werden eingesetzt und aufgelöst: Itraconazol (Janssen-Cilag, Neuss), Clotrimazol sowie Miconazol (beide Antimykotika von Dr. K. Hollborn & Söhne KG, Leipzig) in 2 ml Dimethylsulfoxid, Ketoconazol (Janssen-Cilag, Neuss) in 1 ml 0,2 mol HCl, Griseofulvin in 80% Ethanol und Terbinafin (Novartis, Nürnberg) in sterilem destilliertem Wasser. Die weitere Verdünnung erfolgt in destilliertem Wasser zur Bereitung der Stammlösungen, aus denen danach mit dem noch flüssigen, weil erwärmten D.S.T.-Agar Verdünnungsreihen, die von 0,006 bis 100 µg ml<sup>-1</sup> reichen, hergestellt werden.

Zur Herstellung des Inokulums wird mittels Impföse ein Stück (2 x 2 mm) aus der Kolonie entnommen und in 2 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung mechanisch mittels Glasstab sowie danach über eine Minute mit dem Vortexer suspendiert. Die Suspension wird bei Raumtemperatur über zwei Stunden stehen gelassen, wieder auf dem Vortexer gemischt und dann mittels Multipointinokulator aufgetragen - Inokulumdichten 10<sup>6</sup> und 10<sup>8</sup> KbE ml<sup>-1</sup>. Die Inkubationszeit beträgt sieben Tage bei 26°C.

*In vitro*-Empfindlichkeit von vier ATCC-Dermatophytenreferenzstämmen, die als Kontrollen eingesetzt werden. Bestimmung der MHK mittels Agardilution, D.S.T.-Agar, 26°C, Inkubationszeit 7 Tage.

	<i>T. rubrum</i> ATCC 22402	<i>T. mentagrophytes</i> 18748	<i>T. tonsurans</i> 56186	<i>Microsporum canis</i> 36299
	Antimykotikum/Inokulum			MHK [µg ml <sup>-1</sup> ]
<b>Griseofulvin</b>				
10 <sup>6</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	<0,025	0,39	<0,025	0,39
10 <sup>8</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	<0,025	0,39	<0,025	0,39
<b>Itraconazol</b>				
10 <sup>6</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	<0,0125	0,05	<0,0125	0,05
10 <sup>8</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	<0,0125	0,2	<0,0125	0,2
<b>Fluconazol</b>				
10 <sup>6</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	3,13	50	50	50
10 <sup>8</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	3,13	50	50	50
<b>Ketoconazol</b>				
10 <sup>6</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	<0,05	0,1	<0,05	0,2
10 <sup>8</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	0,1	0,39	<0,05	0,2
<b>Clotrimazol</b>				
10 <sup>6</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
10 <sup>8</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	<0,05	0,1	<0,05	<0,05
<b>Miconazol</b>				
10 <sup>6</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	<0,05	0,39	0,1	0,1
10 <sup>8</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	0,1	0,39	0,2	0,39
<b>Terbinafin</b>				
10 <sup>6</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
10 <sup>8</sup> KbE ml <sup>-1</sup>	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die *In vitro*-Empfindlichkeitstestung von Dermatophyten zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses rückt. Problematisch ist das Fehlen einer standardisierten Methode der Bestimmung der MHK-Werte. Einen hohen Stellenwert nimmt die erstmals von Granade & Artis (1980) beschriebene Mikrodilutionsmethode ein. Trotzdem ist auch die hier vorgestellte Agardilutionsmethode in der Lage, reproduzierbare



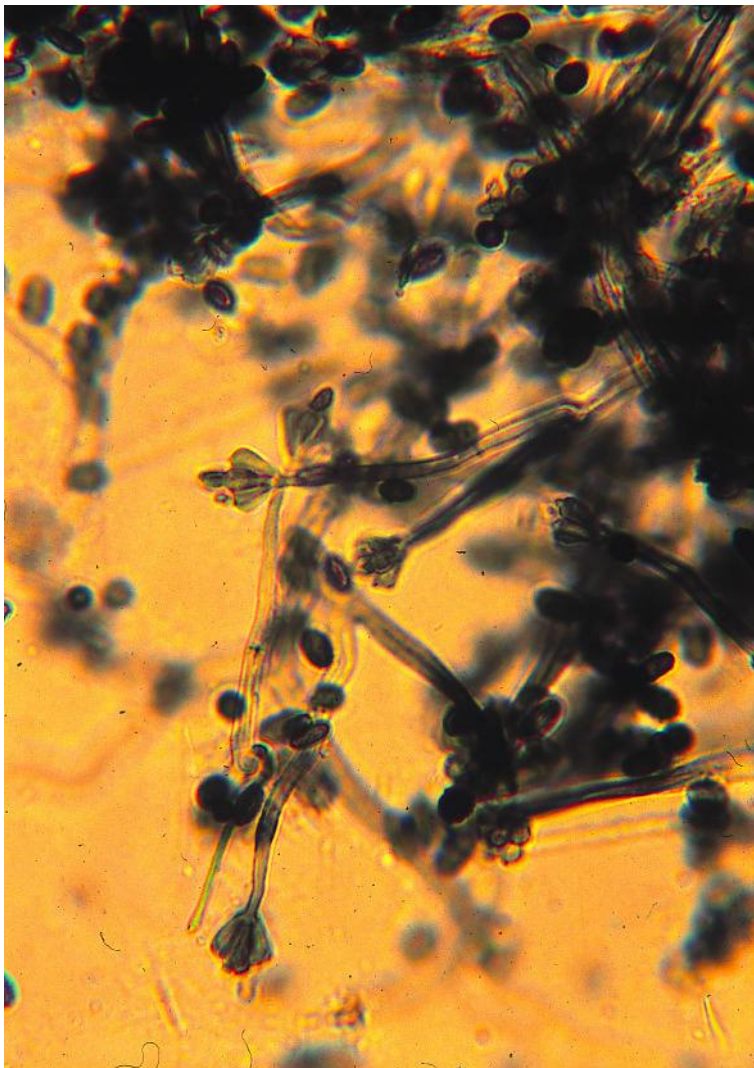
und plausible Ergebnisse zu erzielen, die mit den Werten von Mikrodilutionsmethoden vergleichbar sind.

## **Fadenpilzdiagnostik als alltägliches Problem im Variolabor: pathogenetisch wichtige Vertreter, häufige Kontaminanten. Diagnostik und Mikroskopie.**

### ***Stachybotrys chartarum* (= *S. atra*)**

**Koloniemorphologie:** Auf MEA erreicht dieser Pilz in ca. 7 Tagen bei Zimmertemperatur einen Durchmesser von 2 cm. Schwarz-braune Pigmentierung, flacher Thallus, spärlich ausgeprägtes Luftmycel, das schwarz-braune Pigment diffundiert nach einigen Tagen in den Agar.

Achtung: Bei Anzüchtung aus Umweltproben wird dieser Pilz aufgrund seines langsamen Wachstums leicht übersehen, da er evtl. von *Penicillium spp.* und *Aspergillus spp.* überwuchert wird. In Luftproben ist er sehr selten zu finden.



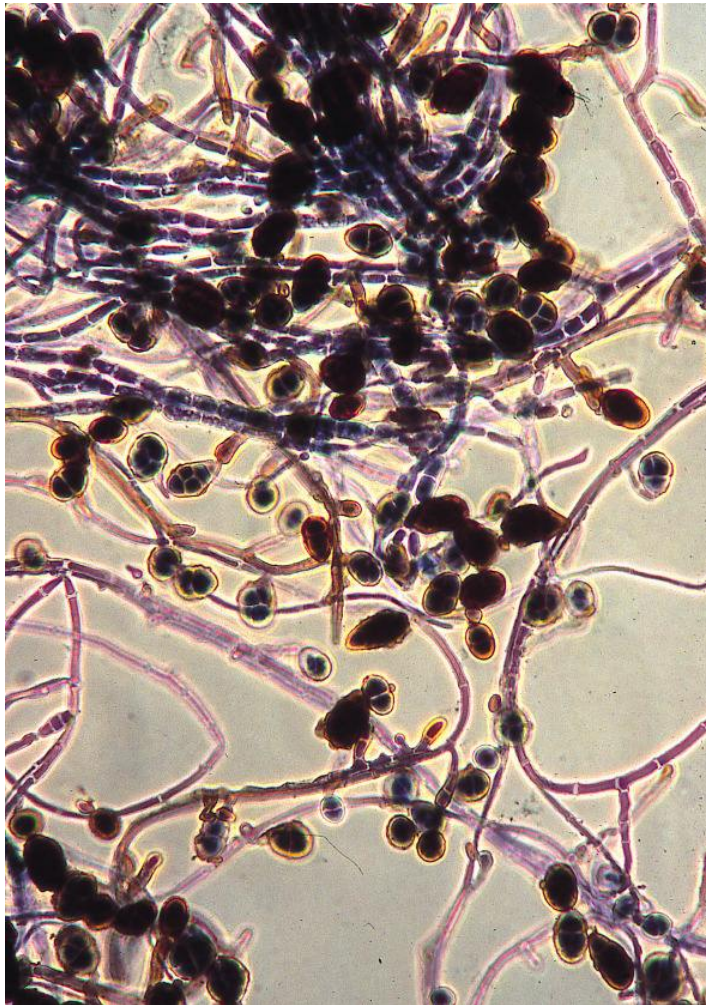
**Mikromorphologie:** Stereomikroskopisch sind sogenannte „slimy heads“ zu sehen, d.h. von Wassertropfen umkleidete Sporen und die zugehörigen konidiogenen Zellen (wichtig bei der orientierenden Zuordnung von Schwärzepilzen aus Mischkulturen).

Die Konidiophoren sind gerade, zunächst hyalin, später dunkelbraun bis schwarz. An ihrer Spitze wird ein Büschel von ellipsoiden Phialiden gebildet. Die Konidien (ca. 8-10 µm) sind deutlich dunkler pigmentiert als die Phialiden

**Medizinische Bedeutung:** Mykotoxikosen (Lebensmittel/ Innenraumbefall), Kontaktdermatitis

### *Ulocladium chartarum*

**Koloniemorphologie:** Auf MEA erreicht der Pilz in ca. 7 Tagen bei Zimmertemperatur einen Durchmesser von ca. 5 cm. Der Thallus ist flach, olivfarben bis dunkelbraun.



**Mikromorphologie:** Die Konidiophoren sind häufig gekniet („geniculate“). Konidien einzeln oder in Ketten, ovoid (*breiter als bei Alternaria spp.*), glatt bis warzig. Typisch: Ausprägung sogenannter „falscher Spitzen“ (false beaks), diese sitzen am Apex des Konidiums als kurze schmale Schläuche auf und bilden Konidiophoren, bei *Alternaria spp.* gehören diese breitbasig aufsitzenden Spitzen zur Konidie.

**Medizinische Bedeutung:** Als Träger des Hauptallergens von *Alternaria alternata* (alt a1) von ähnlicher allergologischer Relevanz (am häufigsten identifiziertes Allergen bei Schimmelpilz-bedingten Allergien)

### *Cunninghamella bertholletiae*

(Zygomycet, Ordnung Mucorales, Familie Cunninghamellaceae)

**Koloniemorphologie:** Auf MEA innerhalb von 3 Tagen bei 37°C Ausbildung einer ca. 3-5 cm großen Kolonie mit weißem Luftmycel. Innerhalb der nächsten Tage Einsetzen einer grauen Pigmentierung unter weiteren Größenzunahme bis zum Überwachsen der ganzen Platte. Das Luftmyzel ist von ausgeprägt filziger Konsistenz.



**Mikromorphologie:** gerade, lange Sporangioforen, an deren Ende Bildung einer Vielzahl von Seitenzweigen, die in einem Vesikel enden. Das Vesikel ist von Sporangiolen dicht besetzt, darin befindet sich jeweils eine Sporangiospore. Wachstum bei 45°C.

**Medizinische Bedeutung:** Seltener Erreger von opportunistischen Mykosen, meistens pulmonale Infektionen. Herkunft des vorgestellten Isolates: kardiopulmonale Infektion bei einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, letaler Verlauf.

***Rhizomucor pusilus***

(Zygomycet, Ordnung Mucorales, Familie Mucoraceae)

**Koloniemorphologie:** Auf MEA innerhalb von 5 Tagen bei 37°C Überwachsen der gesamten Platte. Gebildetes Luftmycel grau pigmentiert, anfangs flach, später bis zum Deckel wachsend

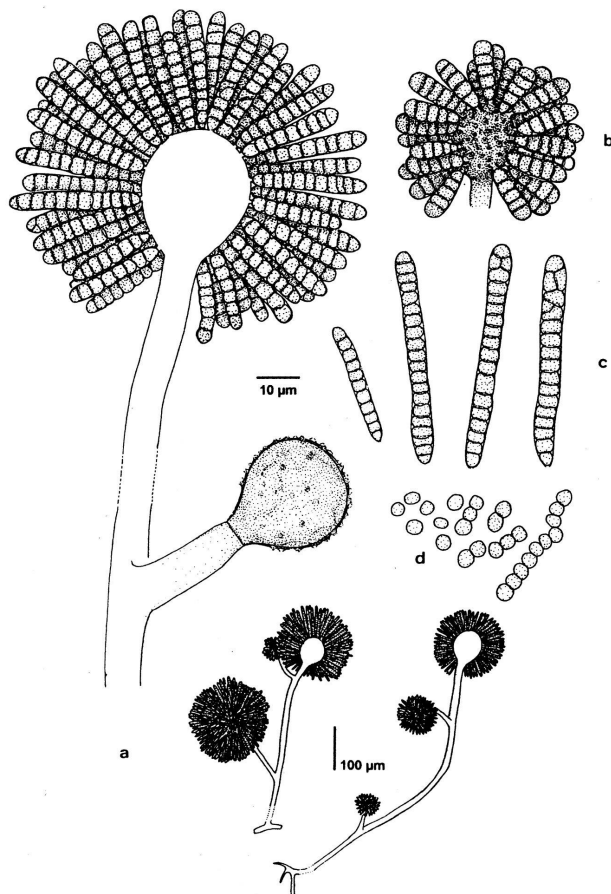
**Mikromorphologie:** Bildung braun pigmentierter Sporangioophoren, Rhizoide vorhanden. Die Sporangioophoren enden in jeweils einem Sporangium. Columella rund bis birnenförmig, keine Apophyse. Sporangiosporen glattwandig, rund. Maximale Wachstumstemperatur: 55°C.

**Medizinische Bedeutung:** Seltener Erreger von opportunistischen Mykosen, meistens pulmonale Infektionen. Herkunft des vorgestellten Isolates: pulmonale Infektion bei einer Patientin mit akuter myeloischer Leukämie, Mischinfektion mit *A. fumigatus*, letaler Verlauf.

***Syncephalastrum racemosum***

(Zygomycet, Ordnung Mucorales, Familie Syncephalastraceae)

**Koloniemorphologie:** Auf MEA innerhalb von 3 Tagen Bildung einer weißlich-grauen Kolonie von 3-4 cm mit lockerem Luftmycel.



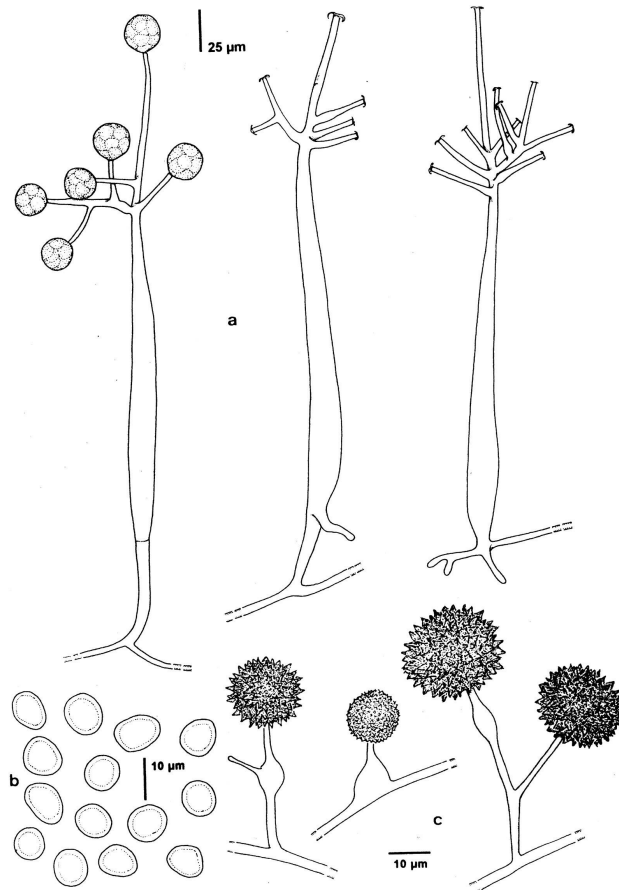
**Mikromorphologie:** Gerade Sporangioophoren, am Ende mit einem Vesikel, daran Bildung von Merosporangien (über die Oberfläche des gesamten Vesikels). In diesem Merosporangium befinden sich mehrere glattwandige, grau-braun pigmentierte Merosporangien. Wachstum bei 40°C. (Abbildung aus De Hoog & Guarro, 1995)

**Medizinische Bedeutung:** Gering. Saprophyt. Das hier gezeigte Isolat stammt aus einer mykologischen Überwachungskultur (Stuhl) eines Patienten von der Knochenmarkstransplantationsstation des UK Dresden, klinisch bestand kein Anhalt für eine invasive Mykose.

### ***Mortierella polycephala***

(Zygomycet, Ordnung Mucorales, Familie Mortirellaceae)

**Koloniemorphologie:** Auf MEA innerhalb von 5 Tagen bei 30°C Wachstum einer ca. 2 cm großen Kolonie mit weißem, fiedrigem Luftmycel.



**Mikromorphologie:** An den Enden der schlank zulaufenden Sporangioophoren befinden sich reich verzweigte Seitenäste mit Sporangien. Bei Ablösung der Sporangien ist an dem Sporangioophor ein kleiner Kragen sichtbar. Die Sporangiosporen sind glattwandig.

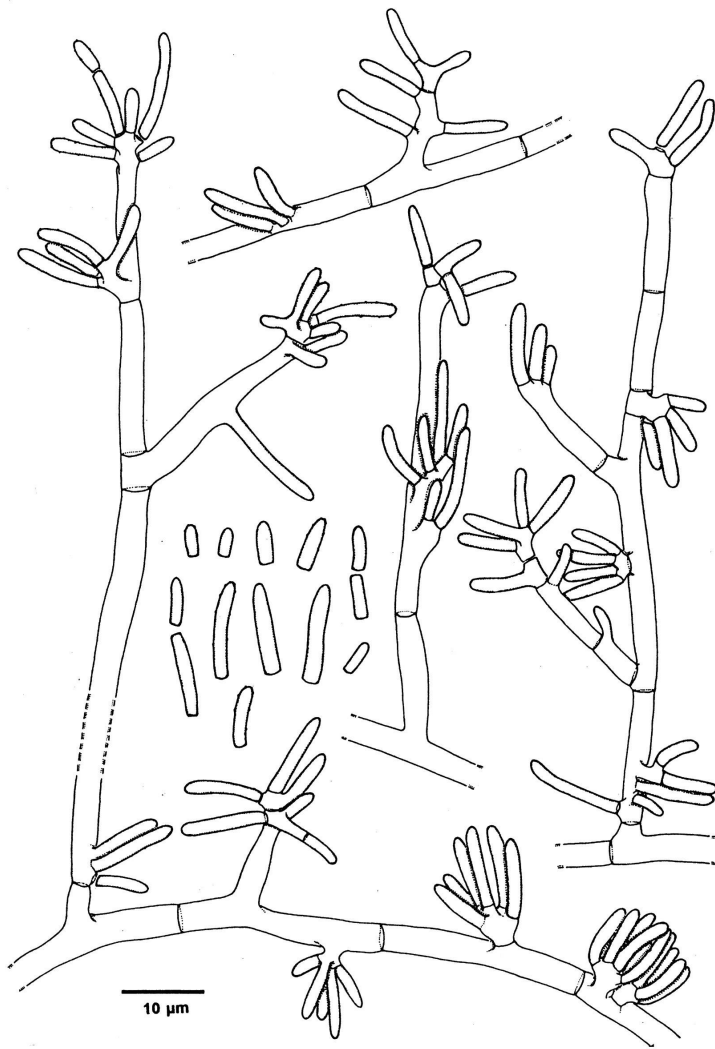
Primitive Rhizoide sind vorhanden. (Abbildung aus De Hoog & Guarro, 1995)

**Medizinische Bedeutung:** In der Veterinärmedizin bei pulmonalen Infektionen von Schafen beschrieben.

Das vorgestellte Isolat ist ein Umweltisolat.

### ***Hormographiella verticillata***

**Koloniemorphologie:** Auf MEA innerhalb von 5 Tagen flächenhaftes Wachstum, teilweise flockig, weiß. Bildung von Konidien am besten bei 30°C auf CMA.



**Mikromorphologie:** Undifferenzierte Konidiophoren mit Bildung von Konidien an deren Apex oder direkt an den Hyphen. Die Konidien sind unpigmentiert, zylindrisch, glattwandig.  
(Abb. Aus De Hoog & Guarro, 1995)

**Medizinische Bedeutung:** Eine Katheterinfektion wurde durch Guarro et al. beschrieben. Das hier vorgestellte Isolat stammt aus der broncho-alveolären Lavage eines Patienten mit Pickwick-Syndrom, Besiedlung, da keine pulmonalen Symptome vorlagen.

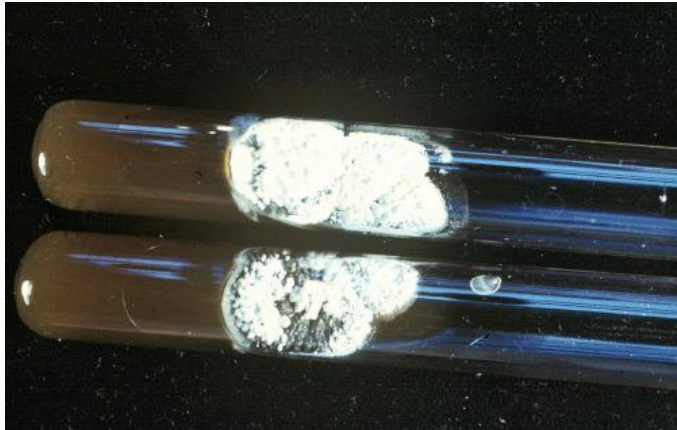
### *Scopulariopsis candida*

**Koloniemorphologie:** Auf MEA bei 25°C innerhalb von 5 Tagen Bildung von 2-3 cm großen weißen Kolonien mit ausgeprägtem sterilem Luftmyzel. Darstellung des konidiogenen Apparates besser auf CMA, dort Bildung zarter granulärer Kolonien.

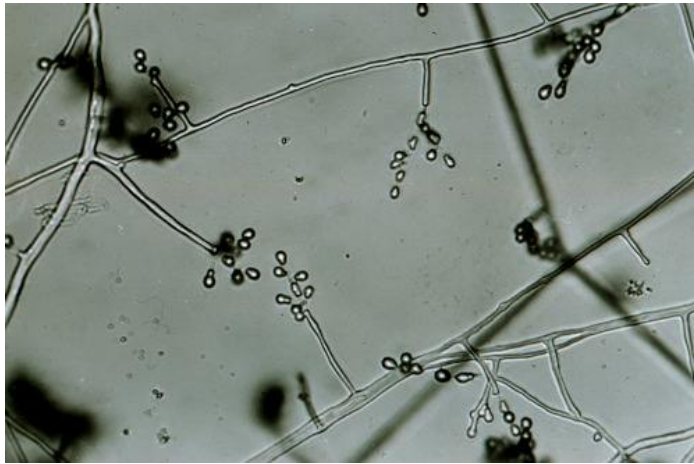
**Mikromorphologie:** Annelidische Konidiogenese, Anneliden am Ende der Hyphen einzeln oder in Arrangements, teilweise flaschenförmig. Konidien in Ketten, rund mit einer flachen Basis (hufeisenförmig), glattwandig.

**Medizinische Bedeutung:** Keratophiler Fadenpilz selten Ursache von Onychomykosen. Sehr häufig in Matratzenstaub (Herkunft des Isolates).

### *Chrysosporium spp.*



**Koloniemorphologie:** Innerhalb von 5 Tagen Wachstum von weißen granulären Kolonien von ca. 3 cm Durchmesser. Teilweise pleomorph.



**Mikromorphologie:** Weiße hyaline Hyphen, teilweise Bildung von einfachen Konidiophoren, daran glattwandige clavate Konidien, teilweise auch Bildung an kurzen Protrusionen oder direkt am Mycel.

**Medizinische Bedeutung:** Keratinolytisch. Selten Erreger von Mykosen der Haut und der Nägel. Herkunft des vorgestellten Isolates: Tinea corporis.

### *Scedosporium apiospermum*

**Koloniemorphologie:** Auf MEA bei 37°C nach 5 Tagen zunächst ca. 2 cm große, weißliche wollige Kolonien, später hellbraun bis dunkelgrau mit einzelnen pleomorphen Zonen mit weißem Luftmyzel. Beurteilung der Mikromorphologie am besten von CMA möglich.



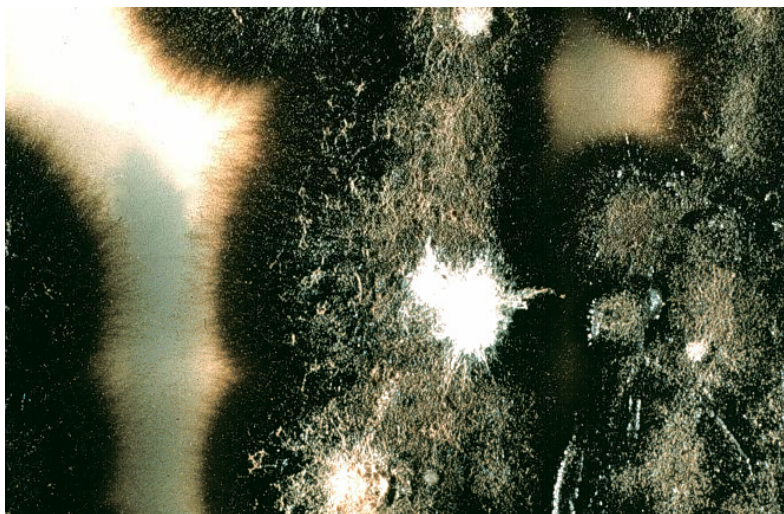
**Mikromorphologie:** Bildung von zylindrischen Konidien entweder einzeln direkt an den Hyphen oder als clavate Konidien an Synnemata (Graphium –Typ). Konidien hyalin bis bräunlich.

Wachstum bei 45°C, Actidion-Resistenz.

(Abbildung aus St. Germain & Summerbell, 1996)

**Medizinische Bedeutung:** Erreger von Myzetomen, Fremdkörperinfektionen, schweren Weichteilinfektionen und systemischen Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten. ZNS-Infektionen nach Ertrinkungsunfällen. Besiedlung bei CF-Patienten, Otitis externa. Herkunft des vorgestellten Isolates: schwere Weichteilinfektion bei einem Patienten nach Nierentransplantation.

### *Scedosporium prolificans*

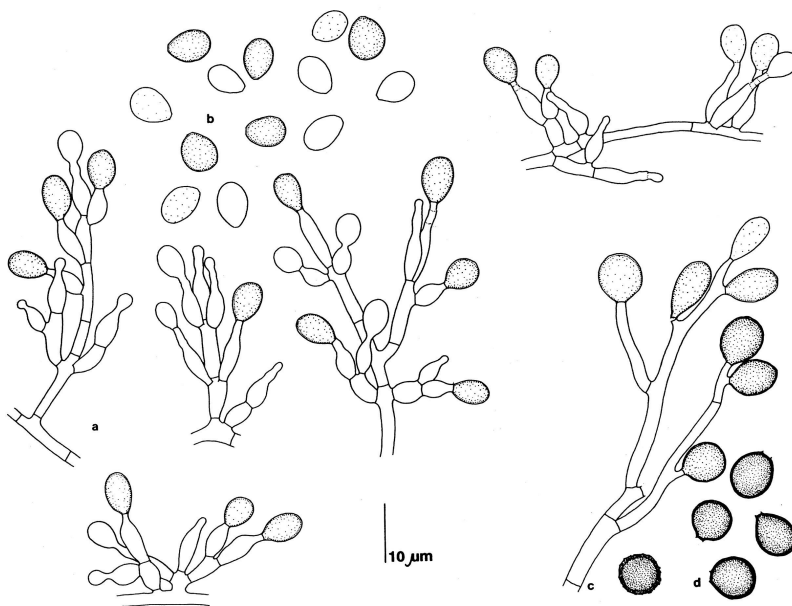


**Koloniemorphologie:** siehe *Scedosporium apiospermum*.



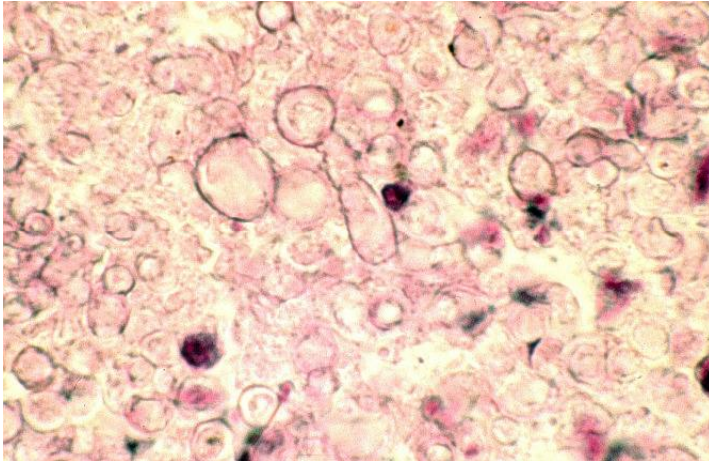


**Mikromorphologie:**  
 Annelidische Konidio-  
 genese. Anneliden  
 flaschenförmig, ein-  
 zeln oder in kleinen  
 Bündeln am Ende der  
 Hyphen. Konidienbil-  
 dung kommt auch di-  
 rekt an den Hyphen  
 vor. Konidien glatt-  
 wandig, rund bis ellip-  
 tisch.  
 Wachstum bei 37°C,  
 Actidion-empfindlich.



**Mikromorphologie:**  
 Annelidische Konidio-  
 genese. Anneliden  
 flaschenförmig, ein-  
 zeln oder in kleinen  
 Bündeln am Ende der  
 Hyphen. Konidienbil-  
 dung. (Abbildung aus  
 De Hoog & Guarro,  
 1995)

**Medizinische Bedeutung:** Erreger von Weichteil- und Fremdkörperinfektionen. Disseminierte Infektionen bei immunsupprimierten Patienten. Herkunft des vorgestellten Isolates: disseminierte Infektion bei einem AIDS-Patienten mit Burkitt-Lymphom.



Lunge: *Scedosporium proliferans* bei HIV-Patienten mit Burkitt-Lymphom.

### *Monascus ruber*

**Koloniemorphologie:** flach, weiß, rötlich tingiert, schnell wachsend (40 mm innerhalb einer Woche), Kolonierückseite: rot-braun, purpur

**Mikromorphologie:** Konidienketten und einzelne, große, mit einer flachen Basis versehene, doppelwandige Konidien, ähnlich *Scopulariopsis*! Ascocarp-Ausbildung (Cleistothecium = geschlossener Fruchtkörper) = an „gestielten“ Hyphen, gefüllt mit zahlreichen Ascosporen.

**Medizinische Bedeutung:** Peritonitis (Britischer Ringversuch 1999!), selten tiefe Mykosen

### *Paecilomyces lilacinus*

**Koloniemorphologie:** flach, weiches Luftmyzel, weiß bis lila tingiert, blaß bis tief purpurfarben, nicht so schnelles Wachstum wie *Paecilomyces variotii*.

**Mikromorphologie:** Ketten von kleinen, ovalen, länglichen Konidien.

**Medizinische Bedeutung:** Cholezystitis, Gallenflüssigkeit (Britischer Ringversuch 1999!), post-chirurgische Endophthalmitis, selten tiefe Mykosen bei immunsupprimierten Patienten

## Literaturverzeichnis

De Hoog GS, Guarro J (1995) Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn and Delft, The Netherlands & Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

DIN - Deutsches Institut für Normung e. V. Medizinische Mikrobiologie - Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Teil 84: Mikrodilu-

tion. Spezielle Anforderungen an die Testung von Pilzen gegen Antimykotika. Entwurf. Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Ref. Nr. E DIN 58940-84: 1999-08, Berlin.

Granade TC & Artis WM (1980) Antimycotic susceptibility testing of dermatophytes in microcultures with a standardized fragmented mycelial inoculum. *Antimicrob Agents Chemother* 17, 725-729.

Gueho E, Midgley G, Guillot J (1996) The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 337-355

Korting HC, Ollert M, Abeck D & the German collaborative dermatophyte drug susceptibility study group (1995) Results of German multicenter study on antimicrobial susceptibilities of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* strains causing tinea unguium. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 1206-1208.

Leeming JP & Notman FH (1987) Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. *J Clin Microbiol* 25: 2017-2019

Mayser P, Haze P, Papavassilis C, Pickel M, Gründer K, Gueho E (1997) Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br J Dermatol* 137, 208-213.

Mayser P, Pape B (1998) Decreased susceptibility of *Malassezia furfur* to UV light by synthesis of tryptophane derivatives. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 315-319.

Mayser P, Wille G, Imkampe A, Thoma W, Arnold N, Monsees T (1998) Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophane as single nitrogen source. *mycoses* 41, 265-271.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania, NCCLS Vol. 17, No. 9, June 1997 (ISBN 1-56238-328-0).

Pfaller MA, Jones, R. N., Messer, S. A. & the SCOPE Participant Group (1998) National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30, 121-129.

Polak A (1997) Antifungal therapy, an everlasting battle. In: *Progress in Drug Research* (Ed. E. Jucker), Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, Odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ & Barry AL (1997) Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro* - *in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infection. *Clin Inf Dis* 24, 235-247.

Schmalreck AF, Kottmann I, Reiser A, Ruffer U, Scharr E, Vanca E (1995) An evaluation of seven methods of testing *in vitro* susceptibility of clinical yeast isolates to fluconazole. *myco-*

ses 38, 359-368.

Schmalreck A-F & Fegeler W (1996) Kriterien zur Empfindlichkeitsprüfung von Fluconazol im Mikrodilutionstest: Vorschlag für eine standardisierte Methode zur Testung von Sprosspilzen. *mycoses* 39 (Suppl. 2), 12-16

St. Germain BS & Summerbell R (1996) Identifying filamentous fungi. A clinical Handbook. Star Publishing Company, Belmont, California, USA

Van Abbe NJ (1964) The investigation of dandruff. *J Soc Cosmetic Chemists* 15, 609-630.

Yarrow D & Ahearn DG: Genus 7. *Malassezia*; in: Kregger-van Rij (ed): The yeasts. A taxonomic study. 2nd ed. Amsterdam, 1988, pp. 882-885