

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

17. November 2000, Leipzig

Am 17. November 2000 fand in Leipzig die 14. Tagung der Arbeitsgruppe „Mykologische Laboratoriumsdiagnostik“ der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG) statt. Damit war Leipzig nach 1999 erneut Tagungsort, und mit ca. 75 Teilnehmern aus dem gesamten Bundesgebiet war die Tagung sowie der anschließende Kurs zur Sprosspilzdifferenzierung ausgebucht.

### » *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 [1]. Wesentliches mikromorphologisches Charakteristikum sind reichlich vorkommende Chlamydosporen. So ist es nicht verwunderlich, dass nur wenige Mykologen und Mikrobiologen diese Hefe im Labor identifizieren und die entsprechenden Isolate i. d. R. als der Spezies *C. albicans* zugehörig betrachtet werden. Nicht zwingend, jedoch überwiegend wird *C. dubliniensis* von AIDS-Patienten mit oropharyngealer oder ösophagealer Candidose bzw. Besiedlung isoliert. Eine diskutierte höhere Adhärenz von *C. dubliniensis* im Vergleich zu *C. albicans* und eine in vitro induzierbare Fluconazol-Resistenz machen es lohnenswert, *C. dubliniensis* in klinischem Untersuchungsmaterial zu identifizieren.

Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit zu *C. albicans* und fehlender Merkmale, die als Selektionskriterien in Mischkulturen geeignet wären, ist der Nachweis von *C. dubliniensis* bislang erschwert. So ist *C. dubliniensis* 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 Identifizierung der neuen Art nicht zu.

Ein einfaches Merkmal zur Verdachtsdiagnose „*C. dubliniensis*“ bei Chlamydosporen bildenden Hefen ist das temperaturabhängige Wachstum. So wächst *C. dubliniensis* nicht oder nur schwach bei 42 °C im Vergleich zu den meisten *C. albicans*-Isolaten.

Auch die biochemische Differenzierung ermöglicht keine sichere Identifizierung. Typisch für *C. dubliniensis* ist die fehlende Aktivität der intrazellulären  $\beta$ -D-Glucosidase, doch es gibt auch *C. albicans*-Stämme mit gleichem Verhalten. Als untauglich hat sich eine Unterscheidung nach der Ausprägung der Grünpigmentierung der Kolonien auf dem Chrom-Agar erwiesen [2].

P. Nenoff<sup>1</sup>, Monika Krüger<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten  
(Direktor: Prof. Dr. U.-F. Haustein),  
Universitätsklinikum Leipzig AöR

<sup>2</sup> Institut für Bakteriologie und Mykologie  
(Direktor: Prof. Dr. Monika Krüger)  
der Universitätstierklinik Leipzig

Staub und Morschhäuser haben beobachtet, dass alle 14 untersuchten subkultivierten *C. dubliniensis*-Isolate im Gegensatz zu *C. albicans*-Isolaten auf *Guizotia abyssinica*-Kreatinin-Agar (= Nigersaat-Agar, sog. Staib-Agar) nach 1–3 Tagen Bebrütung bei 30 °C Chlamydosporen bilden und die Kolonien aufgrund des myzelialen Wachstums außerdem rau sind im Vergleich zu den glatten *C. albicans*-Kolonien [3]. Sollte sich diese Beobachtung auch bei einem größeren Kollektiv von Stämmen bestätigen, so wäre dieser Nährboden ein wesentlicher Schritt zur einfachen Identifizierung von *C. dubliniensis*. Bislang ist eine eindeutige Identifizierung von *C. dubliniensis* nur mit molekularbiologischen und biophysikalischen Methoden (FT-IR-Spektroskopie) möglich.

### Literatur

- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. Nov. Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995; 141: 1507–1521
- Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, Naumann D. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1599–1608
- Staub P, Morschhäuser J. Chlamydospore formation on Staib agar as a species specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 1999; 42: 521–524

### » Hefen in Futtermitteln

Evelin Ullrich, Monika Krüger  
Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Bei Tieren wurden Hefen bisher im Zusammenhang mit sporadischen Aborten, Mastitiden oder als Nebenbefund aus Exkrementen und dem Genitaltrakt erwähnt [1–4]. Wada et al. [5] berichteten über eine *C. glabrata*-Infektion des Vormagens eines Kalbes. Elad [6] untersuchte Kotproben bzw. Magen-Darm-Inhalte von 500 Kälbern mit Diarrhö bis zum Alter von 30d und stellte fest, dass bei 86% der an Diarrhö erkrankten Kälber ab der 2. Lebenswoche *C. glabrata* im Kot nachzuweisen war.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam schon Gedek [7]. Sie wies bei Kälbern, die mit Milchaustauschern ernährt worden waren, vermehrt *C. glabrata* im Kot nach. Diese Hefe hat sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin stetig an Bedeutung gewonnen. Futtermittel (Biertreber und Silagen) sind häufig mit *C. glabrata* kontaminiert [8]. Auch in unseren Untersuchungen von 1997–1998 war eindeutig nachzuweisen, dass Biertreber die Quelle der *C. glabrata*-Infektion in einem Kälberbestand mit hoher Mor-

bidität (Diarrhöen) und Mortalität war. Sie belegen auch, dass *C. glabrata* über Kolostralmilch in den Magen-Darm-Trakt der Kälber gelangte und hier vor allem im Alter von 8–14 Lebenstagen zu schweren Erkrankungen führte. Die massive Ausscheidung der Hefen führte zur Verbreitung der Erreger im gesamten Tierbestand, einschließlich der Umwelt und trug wieder zu Neuinfektionen bei. Mittels Infrarotspektroskopie konnten 2 Subspezies in den Isolaten nachgewiesen und ein Fortbestehen der Infektion im Bestand über die kontaminierte Umgebung der Kälber bewiesen werden.

Dem gegenüber messen Kirkbride et al. [4] *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 pseudo-hyphenbildenden Arten der Gattung *Candida* sehr viel bekannt ist, liegen nur wenig Untersuchungsergebnisse zu *C. glabrata* vor. Da der Nachweis von Hefepilzen in den Faeces von Mensch und Tier in ca. 66% von Gesunden [9] gelingt, stellt die Einschätzung der Quantität und der Pathogenität sowie die Bewertung der Wirtsantwort ein Problem dar [10].

Hinweise aus der Praxis und eigene Untersuchungen zeigen eine Zunahme der Nachweis Häufigkeit von Hefespezies im Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen. Es stellt sich die Frage nach den Quellen dieser Erreger. So wurden 220 Futtermittelproben im Zeitraum vom 1. 1. 1999 bis 30. 8. 2000 auf den Gehalt an fakultativ-pathogenen Hefen untersucht.

Die Untersuchung erbrachte, dass Hefen häufig in Futterproben nachzuweisen sind. Fast alle Arten können als fakultativ-pathogen eingestuft werden. Von 14 Maissilagen waren 10 mit  $10^7$  KBE Hefen/g Material positiv, während die Untersuchung von Körnermais bei nur einer von 4 Proben Hefen ergab.

Koch et al. haben schon 1973 auf den Zusammenhang der geringen Haltbarkeit der Silage durch starke Selbsterwärmung (besonders Mais) hingewiesen und Untersuchungen über die Mikroflora der Maispflanzen im Laufe der Vegetationsperiode bis zum Silieren durchgeführt, um Aussagen über die Ausgangsflora (produktspezifischer Keimbefall) treffen zu können. Sie fanden, dass ab Juli bzw. August (witterungsabhängig) beträchtliche Mengen 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, einen Bereich, der bei Heu und Stroh laut EFMO [11] als erhöht angesehen wird. Interessant ist, dass der Keimgehalt an Blatt und Stengel höher ist als an den Kolben.

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

Erhebliche Nährstoffverluste können auch bei Nachgärungsvorgängen entstehen, die vor allem durch Hefen bedingt sind. Der Hefegehalt von Silage kann sich nach dreitägiger aerober Lagerung um zwei Zehnerpotenzen erhöhen, was beim Probentransport berücksichtigt werden sollte. Terbrack [10] weist darauf hin, dass die Hefekonzentration in gelagerten Kotproben instabil ist und empfiehlt Lagerung der Proben bei +4°C.

Untersuchungen von Koch et al. [12] ergaben, dass 10–20% der über die Vegetationsperiode isolierten Hefen kahmhautbildend waren. Auch hier wurden kahmhautbildende Hefen (*C. krusei*) neben *C. parapsilosis* häufig aus Maissilagen isoliert, wobei *C. krusei* nicht aus dem Körnermais nachzuweisen war. Hayford u. Jakobsen [13] fanden bei spontan fermentiertem Maisteig vor allem *Saccharomyces cerevisiae* und *C. krusei* und schlossen daraus, dass diese Hefen zur produktspezifischen Flor gehörten. Verschiedene Stämme von *C. krusei* sind, wie mit PCR gezeigt, bei der Fermentation von Maisteig beteiligt, es bestehen Unterschiede zwischen Stämmen aus klinischen Isolaten und Nahrungsmitteln.

Bei den Getreidearten fällt auf, dass relativ wenig Hefen isoliert werden konnten. Die Negativbefunde lagen i. d. R. über 60%, wobei

im Weizen am wenigsten nachzuweisen war. Bei der Differenzierung der Hefearten zeigte sich, dass sowohl *C. albicans*, als auch *C. krusei*, *C. glabrata* und *C. tropicalis* häufiger vertreten sind.

Die Beurteilung der anderen Futtermittel ergab, dass Biertreber und Totale-Misch-Ration für Rinder am meisten mit Hefen belastet sind, wobei *C. krusei* dominierte. Die Dominanz von *C. krusei* war ebenfalls in Kraftfutterproben ohne genaue Zertifizierung zu beobachten. Die Pelletierung des Kraftfutters, bei der eine Erhitzung der Einzelkomponenten erfolgt, führt nicht zur vollständigen Eliminierung der Hefen, obwohl sich eine Reduzierung des Keimgehaltes (alle Proben  $\leq 10^3$  KBE/g Material) andeutete.

Bei Ferkelfutter war ein niedriger Hefegehalt zu verzeichnen, wobei die nachgewiesenen Hefearten – *C. albicans* und *C. tropicalis* – über ein hohes Virulenzpotenzial verfügen. Möglichkeiten der Infektion für Ferkel sind aber auch über das Sauenfutter gegeben, das bei unseren Untersuchungen höher belastet war als das Ferkelfutter.

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

#### Schlussfolgerungen

1. Futtermittel sind sehr häufig mit fakultativ pathogenen Hefen kontaminiert.
2. Raufuttermittel waren am stärksten mit Hefen belastet.
3. Silagen, besonders Maissilagen, weisen hohe bis höchste Hefekonzentrationen auf.
4. Aus Silagen unter Zusatz von konzentrierten Futtermitteln, wie Kohlehydraten, Fetten und Proteinen, hergestellte Futtermischungen (Totale-Misch-Ration) garantieren zwar für den Wiederkäuer eine gleichmäßig stabile Futtersversorgung, bergen aber die Gefahr in sich, dass sich Hefen in Abhängigkeit von Umgebungstemperatur und Sauerstoff exzessiv vermehren und die Tiergesundheit negativ beeinflussen.
5. Kraftfuttermittel für Schweine und Rinder (Cerealien, Soja und Futtermischungen) sowie Kraftfutterpellets waren in unseren Untersuchungen zu 33% mit Hefen belastet.
6. Aus Futtermischungen und feuchtem Tierfutter (Biertreber) waren Hefen in 55% nachzuweisen.
7. *C. krusei* wurde in den Futtermitteln als häufigste Hefeart nachgewiesen.
8. 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.
9. Standardisierte Entnahme- und Transportbedingungen sowie ein Laborprotokoll zur Diagnostik sind die Voraussetzungen für vergleichbare Untersuchungen.

#### Literatur

- 1 van Uden N, Sousa CL, Farinha M. On the intestinal yeast flora of horses, sheep, goats and swine. J gen Microbiol 1958; 19: 435–445
- 2 Bisping W. Untersuchungen über die Ätiologie von Sprosspilzinfektionen bei Haustieren. Zbl Vet Med 1961; 10: 325–361
- 3 Mehnert B, Ernst K, Gedek B. Hefen als Mastitisserreger beim Rind. Zbl Vet Med Reihe A 1964; 11: 96–121
- 4 Kirkbride CA, Bicknell EJ, Knudtson WU, Reed DE. Bovine abortion associated with *Torulopsis glabrata*. J Am Vet Med Assoc 1972; 161: 390–391

- <sup>5</sup> Wada Y, Nakaoka Y, Matsui T, Ikeda T. Candidiasis caused by *Candida glabrata* in the forestomachs of a calf. J Comp Path 1994; 111: 315–319
- <sup>6</sup> Elad D, Brenner J, Markovics B, Yakobson B, Shlomovitz S, Basan J. Yeasts in the gastrointestinal tract of preweaned calves and possible involvement of *Candida glabrata* in neonatal calf diarrhea. Mycopathologia 1998; 141: 7–14
- <sup>7</sup> Gedek B. The infestation of the digestive tract of the calf with yeast. Zbl Bakteriologie 1969; 211: 94–101
- <sup>8</sup> Gedek B. Hefen als Krankheitserreger bei Tieren. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1968
- <sup>9</sup> Cohen R, Roth FJ, Delgado E, Ahearn DG, Kaiser MH. Fungal flora of the normal human small and large intestine. N Engl J Med 1969; 280: 638–641
- <sup>10</sup> Terbrack IE. Vergleichende Untersuchungen zu Vorkommen und Biochemie von Hunden, Katzen und Menschen. Leipzig: Diss. Institut für Bakteriologie & Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, 2000
- <sup>11</sup> EFMO. Annual Meeting of the European Feed Microbiology Organization, Leipzig, 28.–30. 9. 1999
- <sup>12</sup> Koch G, Morwarid A, Kirchgessner M. Zum Einfluss der Mikroorganismen der Maispflanzen auf die Stabilität der Silagen. Das Wirtschaftseigene Futter 1973; 19: 15–29
- <sup>13</sup> Hayford AE, Jakobsen M. Characterization of *Candida krusei* from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome profile, polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. J Appl Microbiol 1999; 87: 29–40

#### ► Molekularbiologische Typisierung von *Candida albicans* – praktische Tips für das Genlabor

Anke Edelmann

Institut für Biochemie des Universitätsklinikums Leipzig

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 Ergebnissen molekularer Typisierungsverfahren. Dabei kommen Verfahren wie 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 sensitives, reproduzierbares und schnelles Verfahren. Jenes beinhaltet die Analyse der *C. albicans*-DNA mittels Southern Blot in Verbindung mit einer computergestützten Auswertung der erhaltenen Bandenmuster. Die Verwandtschaftsbeziehungen der untersuchten Isolate können in einem Dendrogramm dargestellt werden.

Southern-Blot-Analyse 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. Beim 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.

Die Methode des Ca3-DNA-Fingerprinting hat den im Folgenden kurz skizzierten Ablauf:

1. Isolation genomischer DNA aus der Hefe.
2. Herstellung von Hefe-Protoplasten.
3. Restriktionsverdau, d. h. Spaltung der hochmolekularen genomischen DNA mit einer Restriktionsendonuclease in definierte Fragmente. Für das Ca3-Fingerprinting wird die DNA mit *EcoRI* geschnitten.
4. Im Anschluss an den Restriktionsverdau erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente in einer DNA-Agarosegel-Elektrophorese.
5. Transfer der DNA auf eine Nylonmembran mittels Vakuum unter Verwendung des VacuGene XL im Vacuum Blotting System.
6. Herstellen einer DNA-Sonde – DNA-Markierung mit Digoxigenin. 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.
7. Hybridisierung und Detektion. Die optimale Prä- und Hybridisierung erfolgt unter Drehen im Hybridisierungssofen. Die dafür notwendige Temperatur hängt von den Eigenschaften der eingesetzten Sonde ab. Bei Verwendung der homologen Ca3-Sonde für *C. albicans* DNA sind 68 °C optimal (eine heterologe Sonde erfordert eine niedrigere Temperatur). Immunologischer Nachweis und Farbdetektion mit Anti-DIG-AP-Konjugat.

#### Literatur

- 1 Sambrook et al. Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 2 Bertram S, Gassen HG. Gentechnische Methoden. Stuttgart: G Fischer, 1991

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

A. Schmalreck

MBS (Mikrobiologischer BeratungsService München)

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 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 80er Jahren. Erst Ende der 80er 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 [1,2] 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 [3–6] und Dermatophyten 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 molekulare 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 1 mm. In der Regel wird die Wellenzahl ( $\nu$ ) als reziproker Wert der Wellenlänge als physikalische Messeinheit in der FT-IR-Spektroskopie angewandt.

Der Infrarotbereich wird in einen Nah- ( $\nu = 12\,300 - 4\,000\text{ cm}^{-1}$ ), Mittel- ( $\nu = 4\,000 - 200\text{ cm}^{-1}$ ) 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 [6].

## 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.
- *Trichophyton* spp.
- *Microsporium canis*

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.

## Differenzierung der wichtigsten fakultativ-pathogenen und apathogenen Sprosspilze

Evelin Ullrich, P. Nenoff

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

Im Jahr 1998 wurden an der Universitätshautklinik Leipzig insgesamt 1739 Pilze (Dermatophyten, Sprosspilze und Schimmelpilze) isoliert. Der Anteil der Sprosspilzisolates 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 (Geotrichum) capitatum</i>	0,1%
synonyme Bezeichnung: <i>Blastoschizomyces capitatus</i>	

Der Anteil der *Candida*-Arten an den 1998 an der Universitätshautklinik Leipzig isolierten 1222 Sprosspilzen betrug 77,5%, mit folgender Verteilung:

<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%
<i>Candida kefir</i>	0,9%
<i>Candida lipolytica</i> (Abb. 1)	0,5%
<i>Candida famata</i>	0,2%

Alle aufgezählten Hefepilzarten und -Gattungen waren Gegenstand des Differenzierungskurses auf der Arbeitstagung. Daneben wurden einige weitere, seltener vorkommende Arten mikroskopisch identifiziert:

- *Candida lusitanae* 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.
- *Candida lambica* (*Pichia fermentans*)
- *Candida norvegensis*
- *Candida pelliculosa*
- *Candida valida* (*Pichia membranaefaciens*)
- *Candida rugosa*
- *Candida* (*Torulopsis*) *pintolopesii* var. *slooffii* spielt in der Veterinärmedizin eine Rolle und wurde von verschiedenen Tierarten isoliert. Darunter sind neben Maus noch Schwein, Pferd, Ratte, Meerschweinchen, Hamster, Mäwen und Pavian.
- *Trichosporon inkin* = selten isolierte *Trichosporon*-Art. Hier handelte es sich um einen Stamm aus Hautschuppen einer Läsion eines 16-jährigen Jungen mit Verdacht auf Mykose der Leistengegend (Rötung, Schuppung, Erosionen). Klinisch als Ursache der weißen Piedra der Haare im Genital- oder Achselhöhlenbereich beschrieben, außerdem selten als Erreger von systemischen, disseminierten Mykosen bei immunsupprimierten Patienten. Zerebriforme, stark gefaltete, raue Oberfläche der Kolonien, ähnlich der Struktur der anderen *Trichosporon*-Arten. 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 anderen *Trichosporon*-Spezies fehlt.
- 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.
- *Cryptococcus neoformans* (*Filobasidiella neoformans*)
- *Rhodotorula rubra* oder *glutinis* (Abb. 2)
- *Rhodotorula mucilaginosa*
- *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. Typisch sind rötlich bis lachs-rote 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 Impfstriches zu sehen, manchmal sogar als spiegelbildlich zur Kulturform im Petrischalendeckel entstandenes Bild! Die Sprosszellen sind langgestreckt, an zwei Polen verjüngt, bisweilen in der Mitte eingeschnürt. Pseudomyzel wird gebildet. Von der Myzelspitze werden nieren- oder sichel-förmige Ballistosporen (Schleudersporen) abgeschleudert!

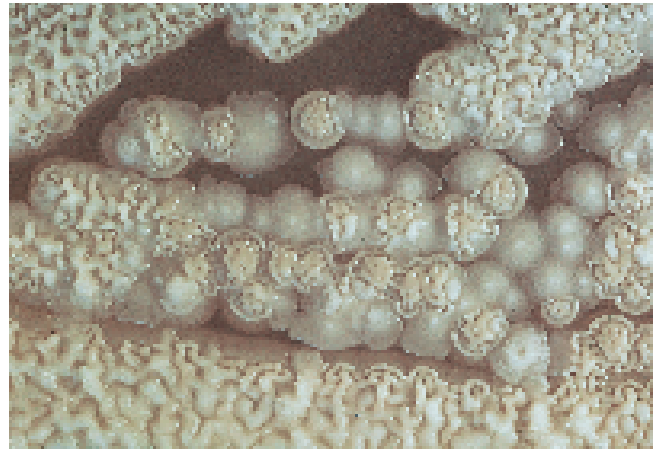


Abb. 1 *Candida lipolytica* auf Glukoseagar. Ausbildung der typischen, stark gefalteten Kolonien.

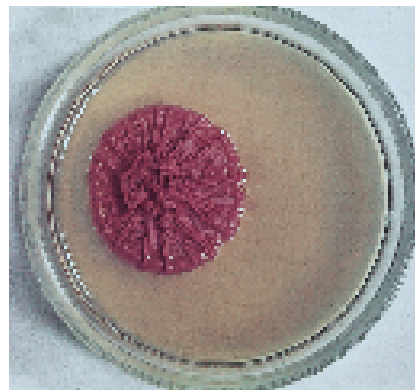


Abb. 2 Die rote Hefe *Rhodotorula rubra* auf Grünagar.

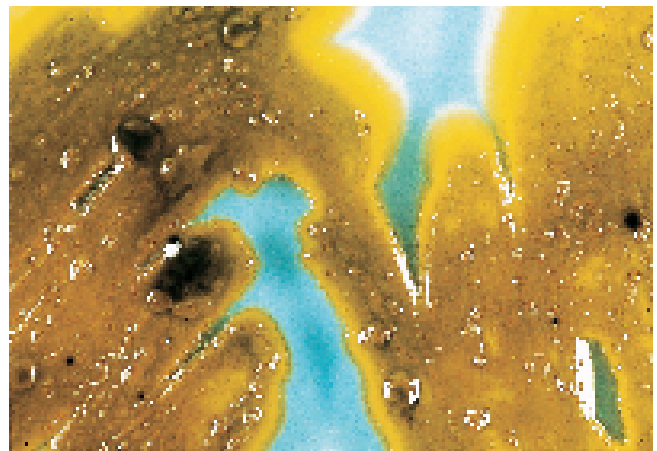


Abb. 3 Der Saprophyt *Aureobasidium pullulans* – eine sog. schwarzer Hefepilz. Die oft ocker gefärbten Kolonien färben sich oft später braun-schwarz.

- *Kloeckera apiculata* ist in der Regel nur als Kontamination anzusehen. Gelegentlich wird er aus Vogelkot isoliert. *Kloeckera apiculata* wächst nicht bei 37°C. Auf Reis-Agar sind die ovalen, an beiden Polen spitz zulaufenden Sprosszellen typisch. Sprossung an beiden Polen ist möglich. Daraus resultiert die charakteristische, nicht zu verkennende Form der Zellen, die fast an eine Spindel erinnert.

- *Aureobasidium pullulans* ist ein flach und schnell wachsender Hefepilz mit beige, cremefarbenen Kolonien (manchmal rosa tingiert), kann jedoch auch braun-schwarzes Pigment auf der Oberseite ausbilden (Abb. 3). Es handelt sich immer um saprophytäres Wachstum, z.B. auf feuchtem Holz, selten Isolation von Haut, Nägeln, dann immer als Kontamination anzusehen. Mikroskopisch sind birnenförmige Konidien direkt an den feinen Hyphen zu sehen. Älteres Myzel formt zahlreiche dickwandige, dunkel pigmentierte, fast rechteckige Zellen, die als „Keim-schläuche“ imponieren und mehrere Konidien gleichzeitig entlassen.
- *Malassezia pachydermatis*
- *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 so genannten asteroid bodies. *Sporothrix schenckii* ist durch zähe, weiß-gelbliche, evtl. später schwärzliche Kolonien mit wenig Luftmyzel, aber mehr submers wachsendem Myzel gekennzeichnet. 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).

#### Literatur

- 1 Naumann D et al. The characterization of micro-organisms by FT-IR spectroscopy. In: Nelson WH (Eds). Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis. New York: VCH, 1991: 43 – 96
- 2 Servas et al. Bio-Tec 1991; 3: 71 – 74
- 3 Kummerle M et al. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. Appl Env Microbiol 1998; 64 (6): 2207 – 2214
- 4 Schmalreck AF, Trankle P, Vanca E, Blaschke-Hellmessen R. Differentiation and characterization of yeasts pathogenic for humans (*Candida albicans*, *Exophiala dermatitidis*) and algae pathogenic for animals (*Prototheca* spp.) using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in comparison with conventional methods. Mycoses 1998; 41 (Suppl. 1): 71 – 77
- 5 Schmalreck AF, Hotzel H. Fourier transform infrared spectroscopy, molecular biologic methods and antimycotic susceptibility patterns for identification and differentiation of cryptococcus species. Mycoses 2000; 43 (Suppl. 1): 61 – 68
- 6 Bastert J, Korting HC, Traenkle P, Schmalreck AF. Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). Mycoses 1999; 42 (9 – 10): 525 – 528
- 7 FT-IR and FT-Raman Spectroscopy in Biomedical Research. In: Gremlich H-U, Yan B (Ed). Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials. New York, Basel: Marcel Dekker Inc., 2001; 323 – 377
- 8 Campbell CK, Johnson EM, Philpot CM, Warnock DW. Identification of pathogenic fungi. London: Public Health Laboratory Service, 1996
- 9 De Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Reus, Spain: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn and Delft, The Netherlands and Universitat Rovira i Virgili, 1995
- 10 Gedek B. 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. Jena: G Fischer, 1968
- 11 Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts. A taxonomic study. 4 th Edition. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo: Elsevier, 1998
- 12 Nenoff P, Mügge C, Haustein U-F. Differenzierung der wichtigsten fakultativ-pathogenen und apathogenen Sprosspilze. Teil I: *Candida*. Derm Prakt Dermatol 2000; 6: im Druck
- 13 Nenoff P, Mügge C, Haustein U-F. Differenzierung der wichtigsten fakultativ-pathogenen und apathogenen Sprosspilze. Teil II. *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Kloeckera*, *Aureobasidium*, *Malassezia* und *Sporothrix*. Derm Prakt Dermatol 2000; 6: im Druck
- 14 Peltroche-Llacsahuanga H, Jenster A, Lütticken R, Haase G. 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 1999; 35: 197 – 204
- 15 Peltroche-Llacsahuanga H, Schnitzler N, Lütticken R, Haase G. Rapid identification of *Candida glabrata* by using a dipstick to detect trehalase-generated glucose. J Clin Microbiol 1999; 37: 202 – 205
- 16 Seebacher C, Blaschke-Hellmessen R. Mykosen. 1. Auflage. Jena: G Fischer, 1990
- 17 Seeliger HRP, Heymer T. Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt. Lehrbuch und Atlas. Stuttgart, New York: G. Thieme, 1981
- 18 St. Germain BS, Summerbell R. Identifying filamentous fungi. A clinical Handbook. Belmont, California, USA: Star Publishing Company, 1996
- 19 Tietz HJ, Ulbricht H. Humanpathogene Pilze der Haut und Schleimhaut. Entnahme, Anzucht und Differenzierung. 1. Auflage. Hannover: Schlütersche Verlag und Druckerei GmbH, 1999
- 20 Wilmer A, Hipler U-C, Neumann E, Wollina U. Wertigkeit des „CHROMagar Candida“ zur Differenzierung wichtiger humanpathogener Candidaspezies. Z Dermatol 1997; 83: 19 – 24

Priv.-Doz. Dr. med. P. Nenoff

Mykologisches Labor  
Hautklinik  
Universitätsklinikum Leipzig AöR  
Stephanstraße 11  
04103 Leipzig

E-mail: nenp@server3.medizin.uni-leipzig.de