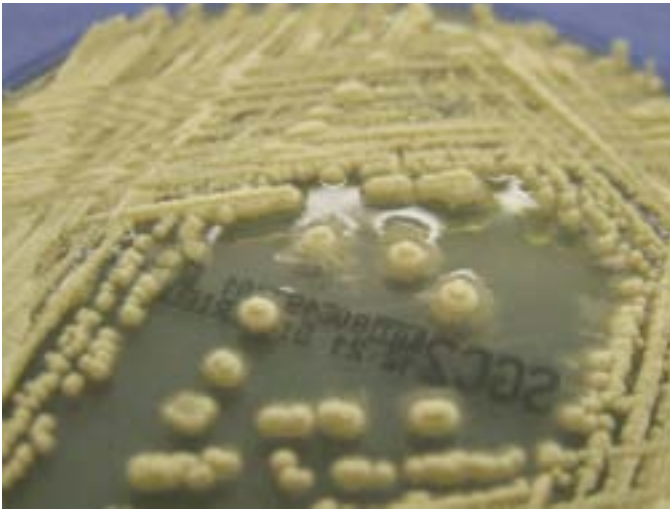


**18. Tagung der Arbeitsgemeinschaft „Mykologische Laboratoriumsdiagnostik“  
unter Schirmherrschaft der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e. V. (DMyKG)  
Leipzig, am 26. Oktober 2007**



Pietro Nenoff  
Laboratorium für medizinische  
Mikrobiologie, Mölbis

Dagmar Rimek  
Thüringer Landesamt für  
Lebensmittelsicherheit &  
Verbraucherschutz, Erfurt

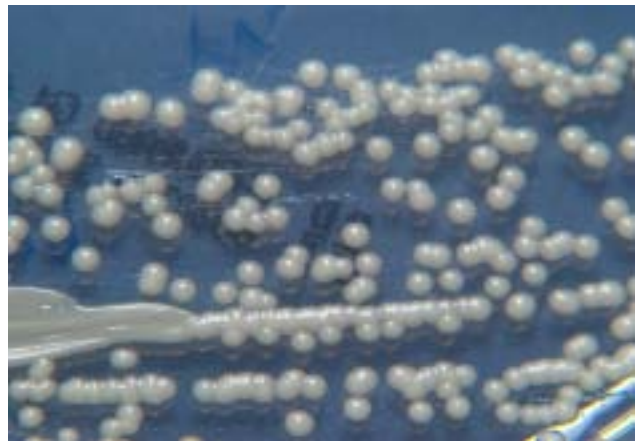
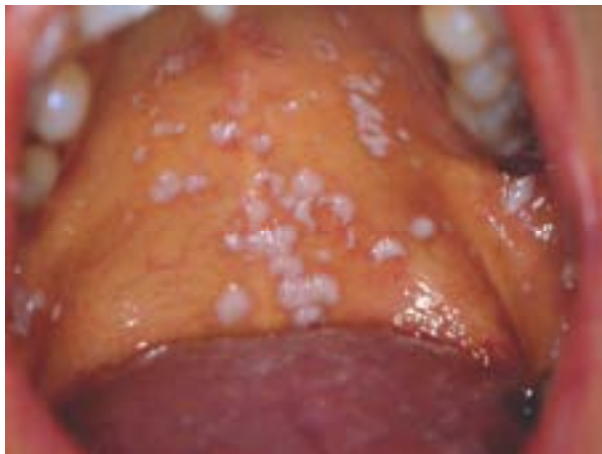
Jan C. Simon  
Klinik für Dermatologie, Venerologie  
und Allergologie  
Universitätsklinikum Leipzig

**Sproßpilzinfektionen - aktuelle Aspekte zur Klinik und Diagnostik**

Pietro Nenoff  
Laboratorium für medizinische Mikrobiologie, Mölbis

*Candida*- und *Cryptococcus*-Infektionen

Sproßpilze der Gattung *Candida* spp. gehören zur Normalflora der Schleimhaut - nicht jedoch der Haut – von Warmblütern, also auch des Menschen. Falls disponierende Faktoren oder Grunderkrankungen vorliegen, kommt es zur Infektion der Schleimhaut im Orintestinaltrakt sowie im Genitalbereich, jedoch auch der Haut, im Einzelfall der Nägel, des Nagelbetts.

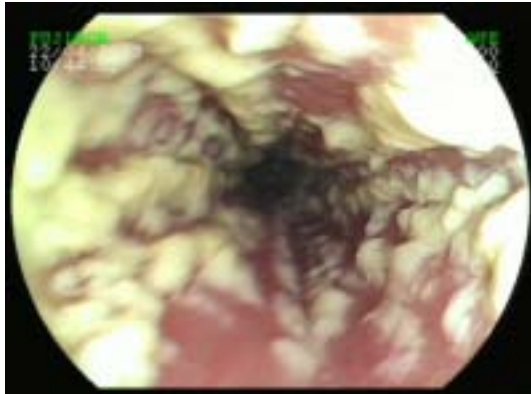


Candidose der Mundschleimhaut bei einer Patientin nach Lebertransplantation. Rechts im Bild *Candida albicans* in Reinkultur auf Sabouraud-Glukose-Agar.

Invasive Candidosen sind pathogenetisch mehrheitlich endogene, seltener exogene opportunistische, meist nosokomiale Infektionen. In den vergangenen zwei bis drei Jahrzehnten war ein deutlicher Anstieg der Inzidenz invasiver, meist nosokomialer *Candida*-Infektionen zu verzeichnen. Die Mortalität an invasiven *Candida*-Infektionen ist in den USA seit 1997 bis zum Jahr 2007 mit 0,4 Todesfällen pro 100 000 Einwohnern gleichbleibend. Ebenfalls in den USA nehmen nach bakteriellen Erregern *Candida* spp. den vierten Platz in der Liste der Erreger, die für nosokomiale septische

Infektionen verantwortlich sind, ein. Der häufigste zugrundeliegende Pilz ist nach wie vor *Candida albicans*. Die Inzidenz der Infektionen durch Nicht-*Candida albicans*-Arten, an erster Stelle *Candida glabrata*, ist jedoch in vielen Ländern, auch in Deutschland, angestiegen, allgemein angesehen als Folge des extensiven Einsatzes des Triazols Fluconazol. *Candida glabrata*-Stämme haben oft (bis 55 % der Isolate) eine verminderte *In vitro*-Empfindlichkeit gegen Fluconazol, man vermutet, dass es zu einer Selektion von Azol-resistenten *Candida*-Spezies gekommen ist.

Invasive Sproßpilzinfektionen durch *Candida*-Arten treten infolge einer Fungämie, die oft Katheter-assoziiert ist (ZVK, gelegentlich Blasenkatheter), auf, im weiteren Verlauf kommt es zu Organabsiedlungen der Pilze im Sinne einer Organmykose und einer Sepsis. Betroffen können alle Organe sein, häufig jedoch die Nieren, Leber, Lungen, Herz, Augen und das Zentralnervensystem, selten auch Knochen und Prostata.



Soor-Ösophagitis durch *Candida albicans* bei immunsupprimiertem Patienten nach Chemotherapie wegen eines Malignoms.

Infektionen durch *Cryptococcus neoformans* werden aerogen erworben, zunächst kommt es zu einer manchmal blande verlaufenden respiratorischen Infektion bis hin zur Pneumonie. Im weiteren Verlauf entwickelt sich bei den immer immunsupprimierten Patienten eine Meningitis und/oder Enzephalitis, die unbehandelt tödlich verläuft.

Systemische Sproßpilzinfektionen durch *Candida*-Spezies und *Cryptococcus neoformans* betreffen nahezu ausnahmslos disponierte Patienten. Heute kennt man eine Vielzahl zugrundeliegender Erkrankungen und Faktoren.

Disponierende Faktoren sowie Grunderkrankungen für Haut- und Schleimhautinfektionen durch Sproßpilze sowie invasive Mykosen

Dispositions-faktoren (oft kombiniert) für invasive Sproßpilzinfektionen	
Immunsupprimierende Erkrankungen	Hämoblastosen, u. a. akute myeloische Leukämie, weitere Leukämie-Formen
Immunsuppression	Zytostatika-induzierte Neutropenie mit Mukositis, Stammzell- und Knochenmarktransplantation, Organtransplantationen (Pancreas- und Leber bevorzugt) GvH (Graft versus host-Disease)-Reaktion, oft in Kombination mit einer Zytomegalie-Infektion
T-zelluläre Abwehrschwäche	angeboren, u. a. Di George-Syndrom, SCID (severe combined immune deficiency) erworben, u. a. AIDS
unspezifische Abwehrschwäche	Autoimmunendokrinopathiesyndrom
medikamentöse Immunsuppression (iatrogen)	u. a. Glukokortikosteroide, Ciclosporin A, Mycophenolatmofetil, Tacrolimus

Weitere Faktoren	zentraler Venenkatheter i.v.-Hyperalimentation lang dauernde Behandlung mit Breitspektrumantibiotika i.v. Drogen-Abusus Frühgeborene alte Menschen z. B. komplizierte chirurgische Eingriffe im Bereich des Abdomens mit Darmöffnung oder nach Darmperforation - Leakage) Verbrennungen
------------------	---

➤ *Infektionen*

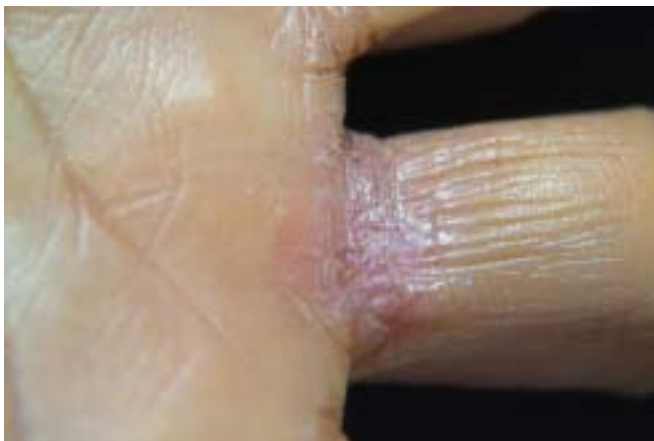
Oberflächliche Infektionen durch Sproßpilze betreffen die Haut, insbesondere die intertriginösen Regionen von Fingern, Zehen, Leisten und Achselhöhlen, häufig ist zudem die intertriginöse Candidose des submammären Bereichs bei disponierten Patientinnen, u. a. bei Adipositas und/oder Diabetes mellitus. Daneben sind die Schleimhäute von Mund, Zunge bis hin zum Ösophagus und dem

Gastrointestinaltrakt im Sinne eines Soors bzw. einer Schleimhaut-Candidose oder *Candida*-Ösophagitis betroffen. Die Vaginalschleimhaut ist nicht selten Ort einer akuten oder chronisch-rezidivierenden *Candida*-Infektion, häufiger treten Vaginalmykosen während der Schwangerschaft auf.



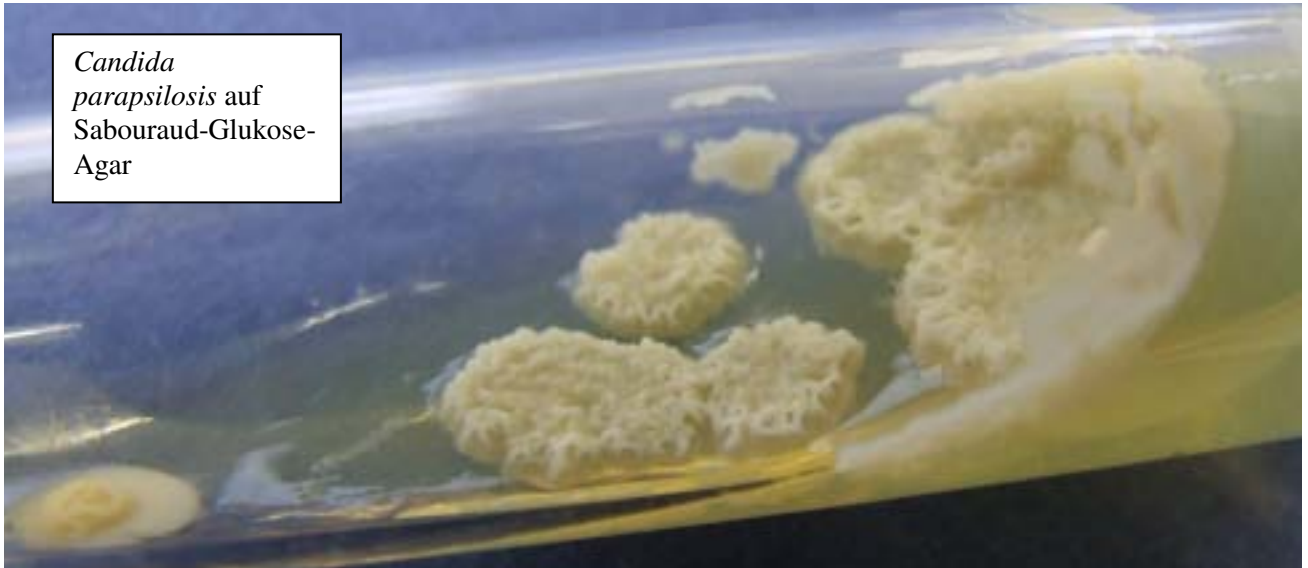
Intertriginöse Candidose der submammären Region auf vorbestehender Psoriasis inversa; massives Wachstum von *Candida albicans*

Nicht zu vergessen sind Sproßpilz-Infektionen der Hautanhangsgebilde, besonders der Nägel (Onychomykose), aber auch des Nagelbetts sowie der perionychialen Region (chronische Paronychie) mit *Candida*-Arten, an erster Stelle *Candida parapsilosis*, gefolgt von *Candida guilliermondii* und *Candida albicans*. Die Onychomykose ist manchmal eine echte Sproßpilz-Monoinfektion, oft jedoch eine Mischinfektion von einem Dermatophyten mit einem oder mehreren Sproßpilzen.



Sekundäre Candidose der Haut und Paronychie sowie Onychomykose der Fingernägel bei einer Patientin mit atopischem Ekzem. Massiver Nachweis von *Candida parapsilosis* aus Hautschuppen sowie Nagelspänen. Behandlung mit Ciclopiroxolamin (Batrafen®) lokal.

*Candida parapsilosis* auf Sabouraud-Glukose-Agar



Klinische Formen invasiver *Candida*-Infektionen sind die Candidämie, die auf ein einzelnes Organ beschränkte invasive Candidose, die als ausgesprochen selten geltende primäre *Candida*-Pneumonie, akute disseminierte Candidose (kann mehrere Organe betreffen) und die chronische disseminierte Candidose (insbesondere Leber, Milz, bekannt als hepatolienale Candidose, aber auch der Niere).

Die Symptome sind in der Regel unspezifisch, Anzeichen für eine invasive Candidose sind u. a. Verschlechterung des Allgemeinzustandes, Fieber (vor allem sog. „Antibiotika-resistentes Fieber“), Unruhe, ZNS-Symptome unklarer Genese, Tachykardie, Tachypnoe, neue Hautläsionen (häorrhagisch, nodulär) = immer embolisch als Folge einer hämatogenen Aussaat der Sproßzellen in die Haut (sekundäre kutane Candidose), Thrombophlebitis an der Eintrittsstelle des zentralen Venenkatheters und dessen Funktionsstörung (*functio laesa*), manchmal auch Sehstörungen (*Candida*-Retinitis und -Endophthalmitis).

Jeder diagnostische Nachweis von Sproßpilzen von der Haut und Schleimhaut sollte kritisch hinterfragt werden, einmal, weil *Candida*-Spezies zur physiologischen Schleimhautflora gehören, zum anderen, weil auf ekzematösen und nässenden Hautläsionen Sproßpilze nicht selten nur als sekundäre Besiedler angesehen werden müssen, der Übergang zur manifesten Haut- und Schleimhautmykose kann fließend sein. Entscheidend ist immer das klinische Bild, nicht der mikrobiologische Sproßpilznachweis. Allenfalls kann basierend auf einer hohen Sproßzellendichte und vom gleichzeitigen Befall mehrerer Körperlokalisationen auf eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer invasiven Mykose geschlossen werden.

Die Diagnosestellung einer invasiven Candidose basiert auf unterschiedlichen Pfeilern, entscheidend sind hinweisende klinische Symptome und Befunde, jedoch auch die Ergebnisse der bildgebenden Diagnostik (Ultraschall, CT, MRT, Röntgen), darüber hinaus verdächtige Befunde am Augenhintergrund (bei Tumorpatienten bzw. Neutropenie oft fehlend) und auch endoskopische Befunde (Ösophagus). Der mikrobiologische Nachweis von *Candida* spp. plus Spezifizierung erfolgt mikroskopisch, kulturell (Blut, Urin, Liquor und Bioptate) und infektionsserologisch. Relativ zuverlässig ist der *Candida*-Mannan-Antigen-Nachweis mit dem Elisa (Platelia®). Zunehmend finden molekularbiologische Methoden, an erster Stelle Amplifikationstechniken, wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von *Candida*-DNS im Blut Anwendung. Problematisch ist jedoch nach wie vor die Interpretation von positiven Ergebnissen, da diese einerseits falsch-positiv sein können, andererseits muss nicht jeder richtige *Candida*-DNS-Nachweis im Blut auch tatsächlich mit einer invasiven Mykose korrelieren.

Die Interpretation von Antikörper-Nachweisen i. S. und anderen Körperflüssigkeiten erfolgt ebenfalls unter Vorbehalt, negative Ergebnisse schließen eine Infektion nicht aus, berücksichtigt werden sollte, dass Anti-*Candida*-IgM und -IgG bereits infolge einer Schleimhautbesiedlung auftreten, d. h. eine sichere Unterscheidung zur invasiven Candidose nicht möglich ist.

Beim Einsatz der systemischen Triazolantimykotika, insbesondere in der Hämatologie/Onkologie, hat seit mehreren Jahren die verminderte *In vitro*-Empfindlichkeit der Sproßpilzisolat, nicht nur von *Candida albicans*, sondern auch von *Candida glabrata* und anderen Spezies, zunehmende Bedeutung.

Eine verminderte *In vitro*-Empfindlichkeit bzw. -Resistenz kann mit einem schlechten Therapieansprechen bzw. Therapieversagen korreliert sein.

Eine *In vitro*-Empfindlichkeitstestung kommt immer dann in Betracht, wenn *Candida*-Spezies außer *Candida albicans* als ursächlicher Erreger isoliert werden. Dies betrifft an erster Stelle *Candida glabrata*, aber auch *Candida krusei*, wobei für letzteren Sproßpilz gilt, dass sich aufgrund der intrinsischen Resistenz Fluconazol als Therapeutikum verbietet.

#### *Cryptococcus neoformans*-Infektionen

Der Sproßpilz *Cryptococcus neoformans* ist die einzige pathogene Art innerhalb der Gattung *Cryptococcus*. Die bekapselte Hefe gehört nicht zur normalen Mikroflora des Menschen, jeder Nachweis ist ein kontrollbedürftiger Befund mit therapeutischen Konsequenzen. Saprophytäre *Cryptococcus*-Arten außer *Cryptococcus neoformans*, die von Haut und Nägeln isoliert werden, sind apathogen.

*Cryptococcus neoformans* mit seinen beiden klinisch relevanten Varietäten *neoformans* (Kapsel-Serotypen A und D) und *gattii* (Serotypen B/C) kommt ubiquitär in der Natur vor. Kryptokokkosen in Europa werden ausschließlich durch Serotypen A/D verursacht. Neuerdings beschrieben wird auch *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* als genetisch differente Varietät. *Cryptococcus neoformans grubii* et *neoformans* befallen vorzugsweise immunsupprimierte Patienten, *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* dagegen immunkompetente Wirte.

Die *Cryptococcus*-Sproßpilzzellen sind aufgrund ihrer mächtigen aus Polysacchariden bestehenden Schleimkapsel relativ resistent gegenüber Umwelteinflüssen, insbesondere gegen Austrocknung, und bleiben Wochen oder Monate vital und potentiell virulent. Trockene, aufgewirbelte Exkremente im Bodestaub werden eingeatmet und führen bei immunsupprimierten Patienten zu einer oft inapparenten Kryptokokkose der Lunge. In der Folge kommt es zur hämatogenen Aussaat, vorzugsweise in das ZNS, sehr selten auch in die Haut. *Cryptococcus*-Zellen werden über die Nieren ausgeschieden. Diese sowie die Prostata bilden nach behandelter Infektion lebenslang ein Erregerreservoir.

#### *Malassezia*-Infektionen

*Malassezia* ist ein lipophiler Spross- oder Hefepilz, der zur normalen menschlichen Hautflora gerechnet wird. Es handelt sich um einen fakultativ-pathogenen Erreger, welcher die Fähigkeit besitzt, unter bestimmten Bedingungen Ursache einer Reihe dermatologischer Erkrankungen zu werden. Dazu zählen Pityriasis versicolor, *Malassezia*-Follikulitis (bei immunsupprimierten Patienten), seborrhoisches Ekzem und Kopfschuppen (letztere Dermatosen sind mit *Malassezia globosa* und *Malassezia furfur* assoziiert).



*Malassezia furfur* auf Sabouraud-Glukose-Agar + 2 % Olivenöl

In den letzten Jahren wurden aufgrund morphologischer, physiologischer, ultrastruktureller und vor allem molekularbiologischer Untersuchungen neue Taxa den drei bereits bekannten Arten *Malassezia furfur*, *Malassezia pachydermatis* und *Malassezia sympodialis* hinzugefügt. Diese umfassen

*Malassezia globosa*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia restricta*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia dermatis* sowie *Malassezia japonica*.

Insbesondere die Spezies *Malassezia globosa* und *Malassezia sympodialis* zeichnen verantwortlich für die Pityriasis versicolor, eine sehr häufige oberflächliche Infektion des Stratum corneum.

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl Mitteilungen über systemische Infektionen durch *Malassezia* in Form der Katheter-assoziierten Sepsis. Betroffen sind unreife Neugeborene bei diversen kongenitalen Erkrankungen und immunsupprimierte Erwachsene, die total parenteral ernährt werden, speziell mit Fettemulsionen (Intralipid). Darüber hinaus gibt es auch Mitteilungen über systemische oder Blutstrominfektionen durch *Malassezia pachydermatis*, aquiriert von einem Krankenpfleger bzw. mittelbar von dessen Schoßhündchen.

Systemische *Malassezia*-Infektionen imponieren mit pulmonalen Infiltraten, außerdem Fieber und Thrombozytopenie. *Malassezia* aktiviert das Blutgerinnungssystem, wobei dem  $\beta$ -Glukananteil des Sproßpilzes die entscheidende Bedeutung für die Verkürzung der kalziuminduzierten Gerinnungszeit zukommt.

Zellwandpolysaccharide von *Malassezia* – Mannan und  $\beta$ -Glukan - sind entscheidend für das Erkennen des Hefepilzes und dessen Bindung an die entsprechenden Mannose- und  $\beta$ -Glukan-Rezeptoren sowie den Komplement-Typ-3-Rezeptor z. B. der phagozytierenden Zellen – Monozyten und polymorphkernige Zellen -, die so eine systemische Infektion verhindern können.

#### *Trichosporon*-Infektionen

Zu den sog. emerging pathogens zählen *Trichosporon*-Arten als Erreger von Systemmykosen. Neben *Trichosporon cutaneum* (früher: *Trichosporon beigelii*) kommt der Spezies *Trichosporon asahii* zunehmend Bedeutung zu, nicht zuletzt wegen der geringen *In vitro*-Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen systemischen Antimykotika. Für Amphotericin B werden minimale Hemmkonzentrationen von 0,01-4  $\mu\text{g/ml}$  erreicht. Bei Patienten mit einer Trichosporonose versagt die Behandlung häufig, die Letalität dieser seltenen Infektion wird bei neutropenischen Patienten, trotz Behandlung mit Amphotericin B, mit 70 % angegeben. Für 5-Flucytosin gibt es neben empfindlichen, auch resistente Stämme. Die Azole - Miconazol, Itraconazol, Ketoconazol und Voriconazol - haben eine höhere *In vitro*-Aktivität, als Amphotericin B.

Gerade wurde über eine sog. Durchbruch (breakthrough)-Infektion durch *Trichosporon asahii* bei einem neutropenischen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie unter Posaconazol-Prophylaxe berichtet. Diese Trichosporonose ließ sich durch kombinierte Gabe von liposomalem Amphotericin B und Voriconazol erfolgreich behandeln.

#### *Geotrichum*-Infektionen

Sehr selten sind Geotrichosen, ausnahmslos immunsupprimierte Patienten betreffend, hervorgerufen durch *Geotrichum candidum* und *Geotrichum capitatum* (alte Taxonomie *Trichosporon capitatum* oder *Blastoschizomyces capitatus*). *Geotrichum candidum* ("Milchschiimmel" = Trivialname) gehört zur Gattung *Geotrichum*. Taxonomisch ordnet man diesen Pilz jedoch bei den Sproßpilzen ein, zur Klasse der Endomycetes bei den Ascomycota gehörend. Der in der Regel als apathogen angesehene Pilz kommt in Sauermilch, Dickmilch, Joghurt, Quark, Käse (zur Reifung, Aromatisierung) und auf Gemüse (Tomaten!) vor. Gelegentlich kann *Geotrichum candidum* im Vaginalsekret nachgewiesen werden z. B. nach Vaginalspülungen, wenn durch Natur- bzw. Milchprodukte das saure Scheidenmilieu wieder hergestellt werden soll. *Geotrichum candidum* wird sehr häufig im Stuhl gefunden. Ein Teil der Stämme wächst bei 37°C, woraus sich erklärt, dass – wenngleich selten - systemische Infektionen auftreten können.

*Geotrichum capitatum* wird gelegentlich saprophytär wachsend im Tracheal- und Bronchialsekret angetroffen, ohne dass diesem Umstand pathognomonische Bedeutung zukommt. Systemische Infektionen sind jedoch beschrieben worden. Interessanterweise werden Infektionen durch *Geotrichum capitatum* manchmal zufällig aufgrund der bekannten Kreuzreaktivität des *Aspergillus*-Galactomannan-Antigen-Nachweises entdeckt. Bei diesen Patienten ist der *Aspergillus*-Antigennachweis positiv, ohne dass es mikrobiologische oder klinische Zeichen für eine Aspergillose gibt, und man deshalb auch an eine Trichosporonose denken sollte.

#### *Saccharomyces cerevisiae*-Infektionen

*Saccharomyces cerevisiae* – Bäcker- oder Bierhefe – gilt selbstverständlich als apathogen. Trotzdem gibt es Beschreibungen von Fungämien bei neutropenischen Patienten, z. B. nach einer prophylaktischen Gabe von *Saccharomyces boulardii* zum Darmaufbau. Bekannt ist, dass *Saccharomyces cerevisiae in vitro* gegenüber Azol-Antimykotika resistent sein kann. Beschrieben wurde der erfolgreiche Einsatz von konventionellem Amphotericin B.

#### *Pichia anomala*-Infektionen

*Pichia anomala* (Anamorph *Candida pelliculosa*) ist ebenfalls ein neuer, zunehmend isolierter Erreger von invasiven Mykosen und Fungämien. Amphotericin B, allein oder in Kombination mit 5-Flucytosin, sowie Fluconazol wurden erfolgreich zur Therapie dieser Infektion eingesetzt, wobei im Einzelfall mit einem Therapieversagen zu rechnen ist.

#### Erreger oberflächlicher und invasiver Sproßpilz-Infektionen

Krankheitsbild	Erreger
Hautinfektionen	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i> <i>Malassezia</i> spp. Sehr selten: <i>Cryptococcus neoformans</i> (primäre und sekundäre kutane Kryptokokkosen)
Schleimhautinfektionen Orointestinaltrakt	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida tropicalis</i>
Vaginalmykosen	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , selten: <i>Candida tropicalis</i> , sehr selten <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Vaginitis)
Nagelinfektionen	<i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida albicans</i> selten: <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i> , <i>Trichosporon mucoides</i> , <i>Geotrichum capitatum</i>
Fungämien durch Sproßpilze/Invasive Infektionen/Organmykosen	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida parapsilosis</i> (fast immer ZVK-assoziiert) selten: <i>Candida krusei</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida lusitaniae</i> , <i>Candida kefyr</i> , <i>Candida dublinsiensis</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida famata</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> , sehr seltene Erreger: <i>Trichosporon asahii</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Geotrichum capitatum</i> , <i>Malassezia</i> spp. (Fungämien), u. a. <i>Malassezia furfur</i> , <i>Malassezia pachydermatis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia anomala</i> (Anamorph <i>Candida pelliculosa</i> )

Anschrift:

Prof. Dr. Pietro Nenoff

Laboratorium für medizinische Mikrobiologie

Partnerschaft Dr. rer. nat. Jürgen Herrmann & Prof. Dr. med. Pietro Nenoff

Straße des Friedens 8

D-04579 Mölbis

Tel.: 034347-50 323; Fax: 034347-50 123  
e-mail: [nenoff@mykologie-experten.de](mailto:nenoff@mykologie-experten.de)

## Methoden zur Resistenztestung von Sproßpilzen

Dr. med. Ralf Fleck

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Mannheim gGmbH,  
Mannheim

Zur systemischen Behandlung von Sproßpilzinfektionen stehen grundsätzlich Antimykotika aus den folgenden 4 Wirkstoffgruppen zur Verfügung:

<u>Gruppe</u>	<u>Beispiele</u>	<u>Wirkmechanismus</u>
<b>Polyene</b>	Amphotericin B	Ergosterol
<b>Azole</b>	Fluconazol, Voriconazol, Posaconazol Itraconazol, Ketoconazol	Ergosterolsynthese
<b>Echinocandine</b>	Caspofungin, Anidulafungin Micafungin	Beta-1,3 Glucansynthese
<b>Pyrimidine</b>	Flucytosin (5FC)	DNA-Synthese

### Testmethoden:

1) Bouillondilution:

z.B.: CLSI M27 A2 (Goldstandard), EUCAST E.Dis 7.1, DIN58940-84, verschiedene kommerzielle Verfahren, teilweise mit Indikatormedien

Durchführung: Verdünnungsreihe in Mikrotiterplatte (meist modifiziertes RPMI-Medium), Ablesung der MHK unterschiedlich bei verschiedenen Wirkstoffgruppen (z.B. komplette Inhibition bei Polyenen, deutliche Inhibition im Vergleich zur Wachstumskontrolle bei Azolen)

Probleme: Trailing Growth bei Azolen; fehlende Breakpoints für die meisten Wirkstoffe, sehr aufwendig

2) Agardiffusion:

z.B. CLSI M44-A (Papierblättchen); Neo-Sensitabs® (Tabletten)

Durchführung: Auf Müller-Hinton-Agar mit Methylenblau-Zusatz (verhindert Trailing) wie bei der Testung von Bakterien, relativ einfach durchführbar

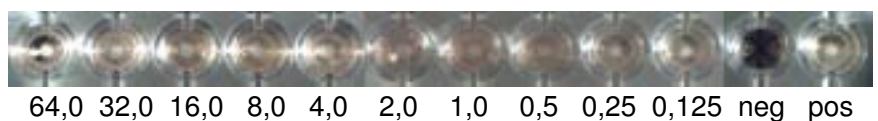
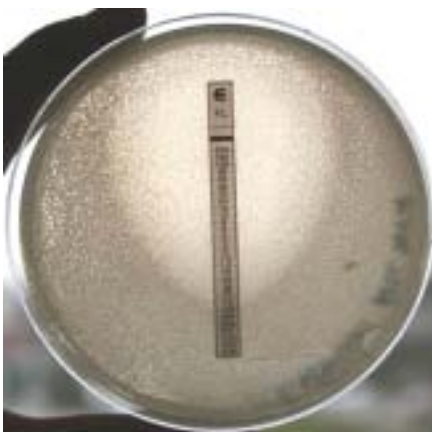
Probleme: Nur für Fluconazol und Voriconazol; *C. glabrata* wird häufig fälschlich als resistent eingestuft.

3) E-Test®:

Durchführung: Agardiffusion auf modifiziertem RPMI-Agar mit Kunststoffstreifen, welcher einen Gradient der Wirkstoffkonzentrationen enthält. MHK kann direkt am Streifen abgelesen werden, relativ einfach durchführbar.

Probleme: teuer(!), Trailing Growth bei Azolen; fehlende Breakpoints für die meisten Wirkstoffe

### Trailing Growth bei Azolen (E-Test und Mikrodilution)



Anschrift:  
 Dr. med. R. Fleck  
 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
 Universitätsklinikum Mannheim gGmbH  
 Haus 22  
 Theodor Kutzer Ufer 1-3  
 68167 Mannheim  
 Tel.: 0621-383-2695  
 Fax: 0621-383-3816  
 email: ralf.fleck@imh.ma.uni-heidelberg.de

## Erste Erfahrungen mit der automatisierten Resistenztestung von Sproßpilzen im Vitek II

Prof. Dr. med. Reinhard Kappe und Dipl.-Biol. Erika Fuchs

Institut für medizinische Laboratoriumsdiagnostik und Mikrobiologie, Südharz-Krankenhaus Nordhausen gGmbH

*Hintergrund.* Die Karte zur Pilz-Resistenz-Testung im vollautomatischen Vitek 2 (bioMerieux, Nürtingen, Deutschland) ist seit 2007 auch in Deutschland kommerziell verfügbar. Sie ermöglicht die Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen (MHKs) der vier Antimykotika Amphotericin B (AmB), Fluconazol (Fluco), 5-Fluorcytosin (5-FC) und Voriconazol (Vori) gegen Sproßpilze. Für Fluconazol stimmten die Ergebnisse gut überein mit denjenigen der Mikrodilutions-Referenz-Methode des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA, USA (1).

*Material und Methoden.* Vitek 2, Pilz-Resistenzkarten AST-YS01, 13 Hefestämme.

*Resultate.* Siehe Tab 1.

**Tab. 1.**

Nr.	Hefestamm	Vitek 2 - MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]				Zeit* [h]	Log <sub>2</sub> -Abw. v. Sollwert**
		AmB	Fluco	5-FC	Vori		
1	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	0,5	<=1	<=1	<=0,12	14,25	0
2	<i>Candida albicans</i> VA9312/07	<=0,25	<=1	<=1	<=0,12	14,00	ND
3	<i>Candida albicans</i> UR8920/07	<=0,25	<=1	<=1	<=0,12	13,25	ND
4	<i>Candida albicans</i> UR8942/07	<=0,25	<=1	<=1	<=0,12	14,00	ND
5	<i>Candida albicans</i> UR9264/07	<=0,25	<=1	<=1	<=0,12	14,50	ND
6	<i>Candida albicans</i> B833/96 (Fluco resistant)	<=0,25	>=64	<=1	1	12,25	0
7	<i>Candida dubliniensis</i> ST1710	<=0,25	<=1	<=1	<=0,12	14,00	ND
8	<i>Candida tropicalis</i> BK2627/07	<=0,25	<=1	32	<=0,12	14,50	0
9	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<=0,25	2	<=1	<=0,12	16,00	0
10	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	0,5	16	8	<=0,12	18,50	0
11	<i>Candida glabrata</i> DSM 70614	0,5	4	<=1	<=0,12	17,25	0
12	<i>Candida lusitanae</i> VA102891/04	<=0,25	<=1	<=1	<=0,12	14,00	ND
13	<i>Cryptococcus neoformans</i> DSM 70219	<=0,25	2	2	KE	22,25	ND

\*Zeit bis zur Ermittlung des Ergebnisses, \*\*CLSI-Mikrodilutions-Referenzmethode, ND nicht durchgeführt, KE kein Ergebnis

*Diskussion.* Die Vitek 2 – MHK-Ergebnisse wichen bei den 13 untersuchten Hefestämmen und den vier getesteten Antimykotika in keinem Fall um mehr als eine Log<sub>2</sub>-Verdünnungs-Stufe von den CLSI-Referenz-Werten ab.

*Schlußfolgerung.* Das Vitek 2 – System ermittelte zuverlässig die Empfindlichkeit von *Candida* spp. und *Cryptococcus neoformans* gegen Amphotericin B, Fluconazol und 5-Fluorcytosin und von

*Candida* spp. auch gegen Voriconazol innerhalb von 12,25 bis 22,25 Stunden (durchschnittlich 15,31 Stunden).

#### Literatur.

1. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 yeast susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. J. Clin. Microbiol. 2007, 45:796-802.

#### Anschrift:

Prof. Dr. med. Reinhard Kappe  
Institut für Laboratoriumsdiagnostik und Mikrobiologie  
Südharzkrankenhaus Nordhausen  
Robert-Koch-Str. 39  
99734 Nordhausen  
Tel.: 03631-412325  
Fax: 03631-412152  
Email: reinhard.kappe@shk-ndh.de

### **Kutane Kokzidioidomykose bei einer immunsupprimierten Patientin mit Sarkoidose. Mykologische Diagnostik unter Berücksichtigung der Arbeitssicherheit beim Umgang mit Krankheitserregern der Risikogruppe 3**

Vennewald I<sup>(1)</sup>, Hansel G<sup>(2)</sup>, Schönlebe J<sup>(3)</sup>, Tintelnot K<sup>(4)</sup>, Seibold M<sup>(4)</sup>, Wollina U<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Institut für Klinische Chemie und Labormedizin, <sup>(2)</sup> Klinik für Dermatologie und Allergologie,

<sup>(3)</sup> Institut für Pathologie des Krankenhauses Dresden-Friedrichstadt,

<sup>(4)</sup> Robert Koch-Institut, Fachgebiet Mykologie, Berlin

#### **Einleitung**

Die Kokzidioidomykose gehört zusammen mit der Histoplasmose zu den häufigsten endemischen Pilzinfektionen in den USA. Hauptendemiegebiete sind die Wüstenzonen von Kalifornien, Arizona und Texas. Weitere ausgedehnte Herde finden sich in New Mexico, Zentral- und Südamerika.

Die Kokzidioidomykose tritt in Europa meistens als Reiseerkrankung auf. Als Infektionsweg kommt fast ausschließlich die Inhalation von Pilzsporen vor, die in Endemiegebieten bei Baumaßnahmen bzw. Ausgrabungen freigesetzt oder nach Sandstürmen, nach Erdbeben, usw. aus dem Erdboden aufgewirbelt werden. Ursache von Infektionen können in Ausnahmefällen auch infizierte Gegenstände (sporenhaltiger Staub an Textilien, Holz und pflanzliches Material), die aus endemischen Gebieten stammen, sein. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch bzw. vom Tier auf den Menschen kann nahezu ausgeschlossen werden. Das Konsiliarlabor für außereuropäische Systemmykose-Erreger in Deutschland am Robert Koch-Institut in Berlin erfasst bis zu 10 Neuerkrankungen pro Jahr, geht aber von einer deutlich höheren Zahl an unerkannten Infektionen aus. Aufgrund der hohen Virulenz des Erregers ist schon mehrmals von Laborinfektionen durch *Coccidioides* spp. berichtet worden. Diese Laborinfektionen machen strenge Vorsichtsmaßnahmen, die allein schon durch den Verdacht auf das Vorliegen des Erregers begründet sind, erforderlich.

Die Gattung *Coccidioides* beinhaltet zwei Arten: *Coccidioides immitis* und *Coccidioides posadasii*. *Coccidioides* spp. ist ein dimorpher Pilz (s.u. Lebenszyklus). 2002 wurde die bisherige Spezies *Coccidioides immitis* in diese beiden Spezies aufgespaltet. Die Unterscheidung ist nur molekularbiologisch z.B. mittels RLFP der gesamten ITS-Region oder am einfachsten durch Amplifikation und Sequenzierung des ITS2-Bereiches möglich. *Coccidioides posadasii* ist in Nord- und Südamerika weit verbreitet, das Vorkommen von *Coccidioides immitis* beschränkt sich hauptsächlich auf ein Gebiet im St. Joaquin Valley in Kalifornien. Daneben gibt es - allerdings in sehr geringer Anzahl - Gegenden, in denen beide Spezies vorkommen. Die beiden Spezies unterscheiden sich weder mikromorphologisch noch infektiologisch.

*Coccidioides* spp. ist ein dimorpher Pilz, der als Saprophyt in seiner Myzelform in trockenen (Wüsten-) Böden vorkommt und dort Arthrokonidien (Arthrosporen) bildet, die hoch-infektiös für den Menschen und bestimmte Haustiere, besonders Hunde, sind. Die parasitäre Phase kommt nur bei einer Infektion im Menschen und Tier vor. Die Inkubationszeit beträgt ca. 1 – 4 Wochen; es kann jedoch mehrere Jahre nach dem Primärbefall der Lunge zu einer Dissemination kommen! Es werden zwei Manifestationsformen der Erkrankung beobachtet: die primäre Infektion der Lunge und die disseminierte Kokzidioidomykose mit Beteiligung aller parenchymatösen Organe, wobei Haut-, Hirn- oder Knochenmanifestationen imponieren. Bei 60 % der Infizierten verläuft die Infektion asymptomatisch. Insbesondere bei Immunsupprimierten werden schwere Krankheitsverläufe beobachtet, die von Rezidiven geprägt sein und unbehandelt einen letalen Verlauf nehmen können. Die Therapiedauer umfasst mehrere Monate bis Jahre.

### Fallbericht

Wir berichten von einer 52-jährigen Patientin mit knotig-ulzerierenden Hautveränderungen nach einem Aufenthalt in Arizona im April 2005. Die Diagnose einer Sarkoidose war erstmalig 1992 gestellt worden. Seit 2003 wurde die Patientin mit Prednisolon und Methotrexat (MTX) therapiert. Zum Aufnahmezeitpunkt im September 2005 lautete die Einweisungsdiagnose aufgrund der bekannten Vorerkrankung „Kutane Sarkoidose“. An den Oberschenkeln, Gesäß und Flanken sowie dem Handrücken zeigten sich bis maximal 2 cm große livid-rote Infiltrate, die zentral zum Teil nekrotisch-eitrig zerfielen. Zusätzlich bestanden noch ein quälender Reizhusten und eine Dyspnoe.

### Diagnostik

*Klinisch:* Im Thorax-CT von Mai 2005 waren multiple, vor allem beidseits hilär vergrößerte Lymphknoten sowie Lungeninfiltrate links im Mittel- und Unterfeld auffällig.

*Pathologische Laborparameter:* CRP 45,6 mg/l, Leukozyten 15,04 Gpt/l, Lymphozyten 8 %, Eosinophile 7 %,  $\gamma$ -GT 2,08  $\mu$ kat/l, LDH 4,22  $\mu$ kat/l.

*Histologie:* Im HE-Präparat der Haut fand sich eine follikelzentrierte, chronisch fortdauernde granulomatös-abszedierende Entzündung mit unterschiedlich großen Abszessen in der Dermis und dem subkutanen Fettgewebe sowie riesenzellhaltige Epitheloidzellgranulome mit kleinherdigen Nekrosen. Im entzündlichen Exsudat waren vereinzelt auffällige, dickwandige, rundliche, bis ca. 50  $\mu$ m große, sog. Sphärulen erkennbar **Abb. 1**.

*Mikrobiologie:* Von einem ulzerierenden Hautknoten am Gesäß wurde routinemäßig ein Abstrich gemacht und zur mikrobiologischen Untersuchung eingesandt. Dort zeigten sich am dritten Tag auf verschiedenen Medien (Blutagar, Kochblutagar und Hirn-Herz-Bouillon) Kolonien mit schimmelpilzartigem Wachstum. Diese Platten wurden dem Mykologischen Labor zur weiteren Differenzierung übergeben. Mikroskopisch zeigte sich steriles Myzel und es erfolgte eine routinemäßige Überimpfung auf Malz-Agar und anschließende Inkubation sowohl bei Raumtemperatur, als auch bei 37°C. Nach zwei Tagen zeigten die Subkulturen temperaturunabhängiges, gutes Wachstum mit flauschigem Aussehen und weißlicher Pigmentierung. **Abb. 2.** Zu diesem Zeitpunkt war die Mikromorphologie nicht richtungweisend, eine Konidienbildung war nicht erkennbar. Der Befund der inzwischen abgeschlossenen histologischen Untersuchung lautete: Verdacht auf außereuropäische Systemmykose, möglicherweise Blastomykose. Demzufolge wurden die Kulturpräparate wiederholt auf charakteristische Strukturen von *Blastomyces dermatitidis* (auf breiter Basis sproßende Hefezellen) sowie anderer Erreger, unter anderem auch *Coccidioides* spp., untersucht. Der Nachweis von Arthrosporen im Lactophenolbaumwollblau-Präparat, identisches kulturelles Wachstum bei RT und 37°C sowie eine fehlende Hefephase bei 37°C erhärteten den Verdacht auf *Coccidioides* spp. Es wurde erneut eine Probe (Wundabstrich) von einem Hautknoten am Gesäß mit Blankophor vorbehandelt und fluoreszenzoptisch untersucht. Die im Eiter nativ nachgewiesenen Sphärulen bestätigten den histologischen und kulturellen Befund. **Abb. 3**

*Kommentar:* Bei hoher Erregerlast sind diese mikromorphologischen Korrelate in der Regel nachweisbar. Diese Form ist selber nicht infektiös und enthält die ca. 2-5  $\mu$ m großen Endosporen, die nach dem Aufbrechen der Sphärule freigesetzt werden und im Körper ihrerseits wieder zur Sphärulenbildung befähigt sind. In der Natur kommt, wie bereits erwähnt, der Erreger im Erdboden

nur als Schimmelpilz in der Myzelphase mit der Arthrokonidienbildung vor. Die Sphärulbildung findet ausschließlich im Organismus statt! **Abb. 4**

Die angezüchteten Kulturen, Patientenserum und die histologischen Präparate wurden unter Beachtung der Versandbestimmungen per Kurierdienst an das Mykologische Konsiliarlabor im RKI Berlin geschickt. Dort wurde das eingesandte Isolat mittels Gensonde als *Coccidioides* spp. bestätigt und abschließend durch PCR und Sequenzierung als *Coccidioides posadasii* identifiziert. Der Titer in der Komplementbindungsreaktion (KBR) gegen *Coccidioides* ergab 1:32, der IgG-Antikörpernachweis im Westernblot war positiv, der entsprechende IgM-Nachweis negativ. Die Höhe des KBR-Titers (Titer ab 1:2 gelten als positiv) sowie das Ergebnis aus dem Westernblot wurden als florides Geschehen bei einer Infektion durch *Coccidioides* spp. interpretiert. Inzwischen hatte eine Auslandsanamnese einen Aufenthalt in Arizona im April 2005 ergeben, nach dessen Rückkehr die Patientin einen Monat später wegen eines nur schwer therapierbaren, pneumonischen Geschehens für sechs Wochen in einem regionalen Lungenfachkrankenhaus behandelt wurde. Ein Erregernachweis war dort nicht erfolgt.

### **Therapie und Krankheitsverlauf**

Die mit Amphotericin B begonnene Therapie musste wegen Nephrotoxizität ab dem 4. Behandlungstag auf Itraconazol umgestellt werden. Diese Therapie wurde mit einer Tagesdosis von Itraconazol (Sempera®) 400 mg/d (2 x 200 mg/d) über 5 Monate fortgeführt. Einen Monat nach Therapiebeginn waren die Lungeninfiltrate im CT vollständig zurückgebildet und die hilären Lymphknoten deutlich verkleinert. Nach 3 Monaten waren die Hautveränderungen abgeheilt. Die Therapie wurde nach insgesamt 5-monatiger Gabe von Sempera® bei normalisierten Entzündungswerten und einer *Coccidioides*-KBR mit einem Titer von 1:4 bei weiterhin positiven IgG-Antikörpernachweis gegen *Coccidioides* spp. im Western blot beendet.

Etwa 10 Monate später wurde die Patientin im November 2006 mit zwei neuen Abszessen am Abdomen und Gesäß vorstellig. Der CRP-Wert war mit 22,4 mg/l nur diskret erhöht. Der mykologisch-kulturelle und histologische Befund ergab erneut eine Kokzidioidomykose, der Titer der *Coccidioides*-spezifischen KBR war 1:8. In Abstimmung mit dem Pulmologen wurde die immunsuppressive Sarkoidose-Therapie reduziert und bis zum jetzigen Zeitpunkt abgesetzt. Die antimykotische Therapie wurde erneut aufgenommen, jedoch auf Posaconazol (Noxafil®), 2 x 400 mg/d umgestellt. Diese Therapie wird gegenwärtig fortgeführt und bis auf leichte Übelkeit gut toleriert. Klinisch konnte eine Abheilung der Hautläsionen beobachtet werden, aber nicht mykologisch. Aus dem Narbenbereich ließ sich *Coccidioides posadasii* jedoch noch im März 2007 kulturell nachweisen. Die aktuelle KBR beträgt 1:4 bei sonst unverändertem serologischem Befund.

Kokzidioidomykose richtet sich nach der klinischen Manifestation und dem Immunstatus bzw. der Grunderkrankung des Patienten. Bei immunsupprimierten Patienten kann eine lebenslange Therapie erforderlich sein.

### **Laborinfektionen und Schutzmaßnahmen**

Aufgrund der hohen Infektiosität von *Coccidioides* spp. kommt es immer wieder zu Laborinfektionen, die mit schweren Verläufen einhergehen können. Dies macht beim Verdacht auf das Vorliegen dieses Erregers, sowie bei anderen Erregern der Risikogruppe 3, strenge Vorsichtsmaßnahmen erforderlich.

Mitarbeiter von mikrobiologischen Routinelabors sind wegen der Seltenheit der Erreger der Risikogruppe 3 in kulturellen Untersuchungsmaterialien zu wenig für die von ihnen ausgehenden Gefahren sensibilisiert, häufig fehlt daher auch die Erfahrung für den Umgang mit Pilzen dieser Risikogruppe. Bei fehlendem Hinweis des Einsenders auf den Aufenthalt des Patienten in Endemiegebieten (häufig fehlende Reiseanamnese!) werden aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien angezüchtete Schimmelpilzisolat oft ohne die nötige Vorsicht behandelt und Schimmelpilze als harmlose Anflugkeime oder Laborkontaminanten betrachtet. Spezielle Kenntnisse sind hilfreich, wie zum Beispiel bei *Coccidioides* spp., der sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37°C als Fadenpilz wächst. Im Gegensatz dazu stehen die außereuropäischen Mykose-Erreger der Histoplasmose, Blastomykose und Parakokzidioidomykose, die bei Raumtemperatur Myzelwachstum zeigen, bei 37°C jedoch überwiegend eine Hefeform entwickeln.

Häufig wird die Verdachtsdiagnose auf einen Erreger einer außereuropäischen Systemmykose zu spät gestellt und damit kann es zu einer erheblichen Gefährdung des Laborpersonals kommen.

Demzufolge ist es erforderlich, grundsätzlich die einschlägig bekannten Vorsichtsmaßnahmen im Labor einzuhalten. Im Falle einer vermuteten oder unbeabsichtigten Freisetzung von infektiösen Erregern aus dieser Risikogruppe müssen die notwendigen diagnostischen Schritte unternommen und gegebenenfalls eine Behandlung initiiert werden.

**Beim ungeschützten Kontakt mit den Pilzen der Risikogruppe 3 werden folgende Maßnahmen eingeleitet:**

1. Ausreichende Desinfektionen des kontaminierten Bereiches, von Gerätschaften, der Arbeitskleidung, usw.; Gefährdung von Mitarbeitern und anderer Personen ausschließen.
2. Behandeln wie ein Unfall. Meldung an die Berufsgenossenschaft wegen zu erwartender hoher Untersuchungs- und noch höherer Behandlungskosten.
3. Namentliche Auflistung anderer betroffenen Mitarbeiter, falls gegeben.
4. Information an den Vorgesetzten, den Betriebsarzt und die/den Sicherheitsbeauftragte(n) des Labors bzw. Krankenhauses.
5. Blutabnahme von allen Betroffenen möglichst innerhalb von 1-2 Tagen, danach Kennzeichnen und Einfrieren von Seren. Eine zweite Blutabnahme wird bei den Personen durchgeführt, die innerhalb von vier Wochen nach dem möglichen Kontakt mit einem Erreger der Risikogruppe 3 Symptome einer Infektion in Form eines unklaren grippalen oder respiratorischen Infektes zeigten. Das erste und zweite Serum dieser Mitarbeiter wird an das Konsiliarlabor für außereuropäische Systemmykose-Erreger mit dem auf der Homepage des Robert Koch-Instituts ([www.rki.de](http://www.rki.de)) unter Infektionskrankheiten A-Z, Mykosen, abrufbaren Untersuchungsauftrag eingesandt. Ein telefonischer Kontakt steht ebenfalls zur Verfügung.
5. Eine Therapieentscheidung erfolgt je nach klinischer, kultureller und serologischer Konstellation.

Stufendiagnostik bei klinischem Verdacht auf außereuropäische Systemmykosen: (Histoplasmose, Kokzidioidomykose, Blastomykose, Parakokzidioidomykose).

1. Kontakt mit dem Einsender aufnehmen. Vordringlich sind:

- a) Fragen auf das Vorliegen oder den Verdacht einer außereuropäischen Systemmykose,
  - b) die Erhebung einer Reiseanamnese
  - c) die akute klinische Symptomatik.
2. Herstellen von mykologischen Nativpräparaten (Blankophor, Gram, Giemsa)
  3. Anlegen der Kulturen bei 37°C und RT auf verschiedenen Medien: Sabouraud-, Hirn-Herz-, Malz-Agar und Hirn-Herz-Flüssigmedium.

Bemerkung: Grundsätzlich sind die Myzelphasen der in Frage kommenden Erreger mit ihren sich nach 5 – 7 Tagen bildenden und leicht ablösbaren Konidien oder Arthrosporen als besonders gefährlich anzusehen. Nicht nur *Coccidioides* spp. bildet bei 37°C die hochinfektiösen Arthronidien, auch *Histoplasma capsulatum* kann bei 37°C neben überwiegendem Hefewachstum infektiöse Mikrokonidien bilden!

**Sicherheitsmaßnahmen**

1. Die Benutzung von Sicherheitsbänken der Klasse 2 ist besonders beim Arbeiten mit Schimmelpilzen unbekannter Herkunft obligat. Die Benutzung von Mund- und Nasenschutzmasken ist nicht sehr hilfreich. Das Tragen von Laborhandschuhen ist erforderlich, da die Hände besonders gefährdet sind und somit einen gewissen Schutz gegen Kontamination darstellen. Die Unterarme sind ebenfalls erhöht gefährdet, spezielle Laborhandschuhe oder andere Maßnahmen können zu einer Verringerung des Infektionsrisikos beitragen. Ringe, anderer Schmuck oder Uhren dürfen unter der Werkbank nicht getragen werden.
2. Beim Transport von Pilzkulturen kann es durch das bloße Bewegen (die Kulturschalen weisen Belüftungsnocken auf!), das Herunterfallen von Kulturplatten oder Glasbruch von Schrägagarröhrchen zur Streuung von Erregern kommen. Generell erweisen sich Glasröhrchen zur Vermeidung der Freisetzung von Pilzsporen geeigneter als Platten. Die Wattestopfen müssen fixiert sein, z.B. durch Parafilm®. Eine Absicherung durch einen zweiten, transparenten Plastikbehälter erhöht die Sicherheit.

3. Eine deutliche Kennzeichnung verdächtiger Kulturen und eine von der Routine getrennte Aufbewahrung sind erforderlich.
4. Kontakt mit dem Kliniker aufnehmen und nach einer Veranlassung bzw. dem Ergebnis pilzspezifischer Färbungen (Grocott, PAS) von Schnittpräparaten fragen, gegebenenfalls diese veranlassen.
5. Bei erhöhtem Verdacht auf außereuropäische Mykose folgende Materialien an das RKI in Berlin schicken:
  - Untersuchungsantrag mit ausführlicher Anamnese des Patienten.
  - Erreger-Isolat als Schräg-Kultur, Stichkultur o. ä. unter Beachtung der Versandbestimmungen (s. u.). Die Vermeidung von Glasmaterial hat Vorrang, andernfalls gut gegen Glasbruch sichern.
  - Patientenserum
  - Vorhandene, gefärbte Schnittpräparate (HE, PAS, Grocott) und zusätzlich zwei ungefärbte Leerschnitte Die Originalkulturen werden nur mit Kurierdienst TNT als „Diagnostische Proben“ Kategorie B, UN-Nr. 3373, Verpackung P650 befördert. Der Postweg ist für die lebenden Pilzerreger der Risikogruppe 3 untersagt. Fixierte bzw. gefärbte Schnittpräparate und Leerschnitte können mit der Bundespost ohne besondere Kennzeichnung versandt werden, Patientenserum als „Diagnostische Proben“ UN-Nr. 3373, Verpackung P650.

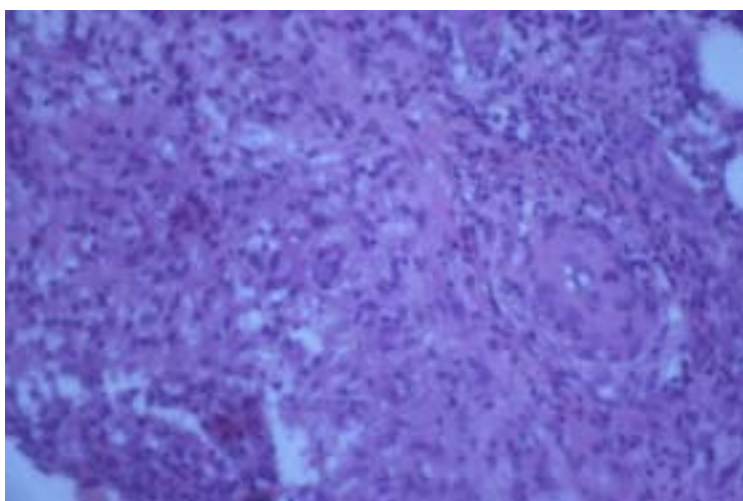
**Bitte beachten:**

Eine telefonische Ankündigung des Untersuchungsmaterials im Mykologischen Labor des RKI Berlin wird empfohlen.

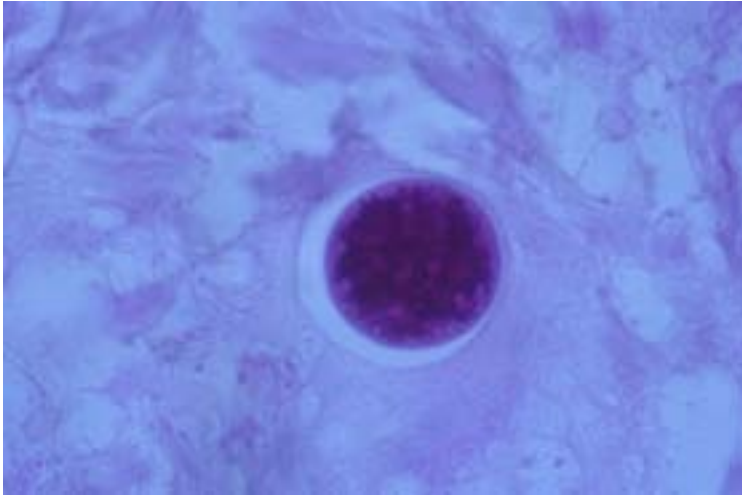
Nicht versendetes Kulturmaterial verbleibt im eigenen Labor mindestens bis zur Bestätigung des Eingangs im Konsiliarlabor, besser jedoch bis zum Eintreffen des Befundes vom RKI. Danach müssen im Falle der Bestätigung eines Erregers der Risikogruppe 3 alle angelegten Original- und Subkulturen sicher vernichtet werden, da gezieltes Arbeiten mit diesen Erregern eine spezielle Genehmigung erfordert und nur in einem L3-Labor durchgeführt werden darf.

**Danksagung**

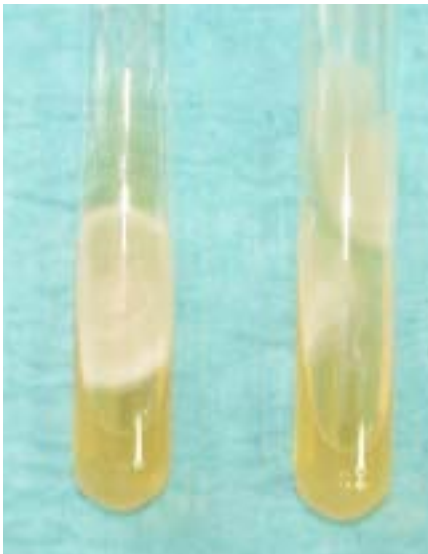
Für die Mitarbeit möchten wir uns ganz herzlich für die wertvolle Mitarbeit bei Marko Kaiser vom Labor Klinische Mykologie des Krankenhauses Dresden-Friedrichstadt und technischen Assistentinnen des Konsiliarlabors für außereuropäische Systemmykose-Erreger RKI Berlin: Elisabeth Antweiler, Chang-Ok Han und Heidemarie Losert bedanken.



**Abb. 1**  
 a) Riesenzellhaltige Epitheloidzellgranulome mit kleinherdigen Nekrosen. HE-Färbung, Vergrößerung x 32



**b)** Sphärule von *Coccidioides posadasii*. HE-Färbung, Vergrößerung x 130.



**Abb. 2**  
Weißliches, flauschig-watteartiges Wachstum von *Coccidioides posadasii* auf Sabouraud- und Malz-Agar nach 10 Tagen Inkubation bei 37°C.



**Abb. 3**  
Blankophor-gefärbtes Nativpräparat vom Eiter (Wundabstrich vom ulzerierenden Hautknoten) mit typischen Sphärulen von *Coccidioides posadasii*. Vergrößerung x 65

**Abb. 4**

Lebenszyklus von *Coccidioides*-Arten (Kwon-Chung K.J, Bennet J.E. Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.)

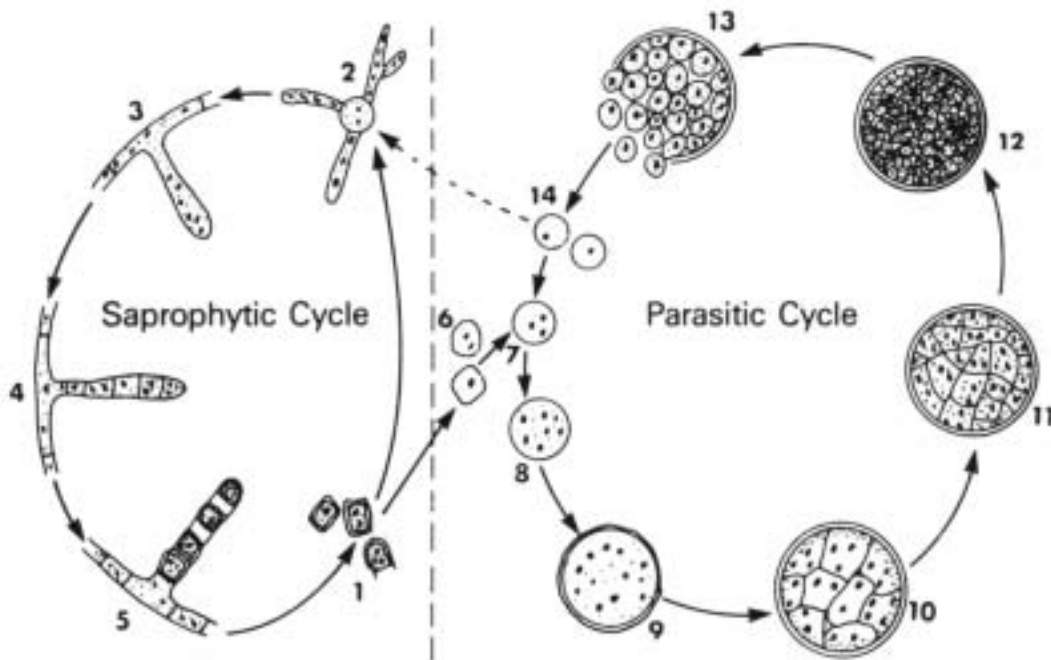


Fig. 15.14. Saprophytic and parasitic life cycles of *Coccidioides immitis* (arrow represents obligatory steps, while broken arrow indicates nonobligatory steps). 1, Liberated arthroconidia. 2, Germinating spore (arthroconidia or endospore). 3, Hyphae with multinucleate sporophore. 4, Synchronous septation in a sporophore. 5, Arthroconidial formation. 6, Swollen arthroconidia. 7, Young spherule. 8, Multinucleate spherule. 9, Spherule with thickened wall. 10 and 11, Spherule with multiple cleavage planes that divide protoplasm. 12, Mature spherule with endospores. 13, Ruptured spherule releasing endospores. 14, Freed endospores.

**Literatur**

- Kwon-Chung K.J, Bennet J.E. Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.  
 Salfelder K. Pilzinfektionen beim Menschen: Hamburg, Zürich Omni Med, 2000.  
 Seeliger P.R, Heymer Th. Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt. Stuttgart, New York: Georg Thieme, 1981  
 DiSalvo A.F. Occupational mycoses. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983  
 Anstead GM, Corcoran G, Lewis J, Berg D, Graybill JR: Refractory Coccidioidomycosis Treated with Posaconazole. Clinical Infectious Diseases 2005; 40: 1770-1776  
 Galgiani JN, Ampel NM, Blair JE, Catanzaro A, Johnson RH, Stevens DA, Williams PL: Coccidioidomycosis. Clinical Infectious Diseases 2005; 41: 1217-1223

**Gültige Versandbestimmungen**

Die Versandbedingungen für medizinisches und biologisches Untersuchungsgut nach DIN 55 515  
 Regelungen für die Beförderung von ansteckungsgefährlichen Stoffen, Brief National vom  
 09.11.2004.  
 Neue Bestimmungen zur Beförderung ansteckungsgefährlicher Stoffe. Regelungen der ADR, IATA,  
 DGR und der Deutschen Post seit 1.1.2005 in Kraft. Epidemiologisches Bulletin von RKI Nr. 4/2005  
 Weitere Hinweise und Informationen dazu im Internet  
 unter:[http://www.deutschepost.de/mlm.html/dpag/images/download/agb.Par.0086File.pdf/ansteckungsgefaehrliche\\_stoffe\\_091104.pdf](http://www.deutschepost.de/mlm.html/dpag/images/download/agb.Par.0086File.pdf/ansteckungsgefaehrliche_stoffe_091104.pdf)  
<http://www.rki.de/INFEKT/EPIBULL/EPI.HTM> sowie bei der Gefahrguthotline des Kurierdienstes  
 TNT unter der Tel. Nr. 02241 - 497/5070.

Anschrift  
Dr. Irina Vennewald  
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin  
Krankenhaus Dresden Friedrichstadt  
Friedrichstraße 41  
01067 Dresden  
Tel.: 0351-480-3861  
Fax: 0351-480-3826  
Email: vennewald-ir@khdf.de

## Stellenwert von Antigen- und Antikörpertesten in der Diagnostik der invasiven Candidose

PD Dr. med. Dagmar Rimek  
Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Dezernat Medizinische Mikrobiologie, Erfurt

Zur Diagnostik invasiver Candidosen stehen neben dem direkten Erregernachweis mittels Mikroskopie und Kultur auch serologische Methoden – Antigen- und Antikörperteste – zur Verfügung. Bei oberflächlichen Haut- oder Schleimhautcandidosen ist eine serologische Diagnostik nicht indiziert.

### *Candida*-Antigennachweis

Für den *Candida*-Antigennachweis aus Serum stehen kommerzielle Latexagglutinationsteste (LAT) und Enzymimmunoassays (EIA) zur Verfügung.

Ein seit langem verfügbarer LAT zum Nachweis eines thermolabilen Neo-Antigens ist der sogenannte CandTec-Test (Fa. Ramco, Vertrieb Fa. Biermann). Dieses Neo-Antigen soll mit Komplexen aus Mannan und IgM identisch sein. Der vom Hersteller angegebene cut-off von  $\geq 1 : 4$  wird von den meisten Autoren akzeptiert, ist jedoch in der Literatur durchaus umstritten. Bei Immunkompetenten kann die Anhebung des Grenzwertes auf  $1 : 16$  die Spezifität verbessern. Der Test ist wenig sensitiv mit Angaben zwischen 25 - 87% und insbesondere bei Immunsupprimierten häufig falsch negativ. Ein anderer LAT ist der Pastorex *Candida* (Fa. Bio-Rad). Dieser Test weist *Candida*-Mannan im Serum nach, basierend auf dem monoklonalen Rattenantikörper EB-CA1, der gegen Mannanantigen von *Candida albicans* gerichtet ist. Der Test hat mit einem Grenztiter von  $1 : 1$  eine Nachweisgrenze von 2,5 ng Mannan pro ml Serum. Er zeigt mit 100% eine hohe Spezifität, die Sensitivität ist mit 25 - 53% aber gering.

Zur Verbesserung der Nachweisgrenze des zuletzt genannten Mannan-LAT steht seit 1999 der Platelia® *Candida* Mannan Antigen Enzymimmunoassay (Fa. Bio-Rad) zur Verfügung. Dieser Sandwich-EIA beruht auf dem gleichen Antikörper wie der Pastorex LAT, ist jedoch 10-fach empfindlicher mit einer Nachweisgrenze von 0,25 ng Mannan pro ml Serum. Ab 0,5 ng/ml wird ein Resultat als positiv bewertet. Westernblotuntersuchungen und Untersuchungen mit *Candida*-Antigensuspensionen ergaben Kreuzreaktionen auch mit Mannanen von den klinisch relevanten Spezies *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii* und schwächer mit *Candida krusei* und *Candida parapsilosis*. Bisherige klinische Studien erbrachten sehr unterschiedliche Ergebnisse. So wurde die Sensitivität des Testes mit 40 - 86% angegeben, die Spezifität lag je nach untersuchter Patientengruppe zwischen 32 - 98%. Insbesondere ist es fraglich, ob mit dem Mannan-Nachweis aus Serum eine Unterscheidung zwischen *Candida*-Kolonisation und invasiver Candidose getroffen werden kann. In einer Arbeit wurde gezeigt, dass bei *Candida*-Meningitis auch Liquor als Untersuchungsmaterial geeignet war.

Ein zweiter EIA ist der SERION ELISA antigen *Candida* (Fa. Virion-Serion). Dieser Test beruht auf einem polyklonalen anti-Mannan-Antikörper vom Kaninchen. Mittels Ein-Punkt-Quantifizierung werden anhand eines Standards Einheiten pro ml berechnet. Der Grenzwert liegt bei 2,3 U/ml. Sensitivität (67-80 %) und Spezifität (93 %) sind laut Herstellerangabe hoch, klinische Studien wurden zu diesem Test allerdings noch nicht veröffentlicht.

### *Candida*-Antikörpernachweis

Für *Candida*-Antikörpernachweise gilt:

- Die häufig vorhandene kommensale Besiedlung des Menschen mit *Candida* spp. bedingt einen geringgradigen Antikörper-Basistiter in der Bevölkerung. Dieser Grundtiter muss bei der Bewertung der Höhe von *Candida*-Antikörper-Bestimmungen berücksichtigt werden. Darüber hinaus bedingt er, dass eine einmalige *Candida*-Antikörper-Bestimmung weitgehend ohne Aussagewert ist. Ein Hinweis auf eine Candidose ergibt sich erst bei einem signifikanten Titeranstieg innerhalb weniger Tage.
- Ein signifikanter Titeranstieg von Anti-*Candida*-Antikörpern zeigt eine immunologische Auseinandersetzung mit *Candida*-Antigenen an. Er ist als alleiniger Test kein Beweis für das Vorliegen einer invasiven Candidose.
- Immunsupprimierte Patienten zeigen meist keine oder nur eine verminderte Antikörperbildung. Bei diesen Patienten können signifikante Titeranstiege daher ausbleiben.
- Es bestehen zwar Antigen-Gemeinschaften zwischen verschiedenen *Candida*-Arten, jedoch werden Infektionen durch nicht oder wenig kreuzreagierende Sproßpilze wie z.B. *C. krusei* durch die verfügbaren Antikörper-Teste nicht erfasst.

#### Kommerziell verfügbare Testformate

Nachweis von Gesamtantikörpern (IgM, IgG, IgA):

1. Indirekte Hämagglutinationsteste (IHA): Grenztiter > 1 : 160
2. EIA (Platelia Candida AK, Fa. BioRad): Anti-Mannan-Antikörper

Getrennter Nachweis von IgM-, IgG- und IgA-Antikörpern gegen *Candida*:

1. EIA: verschiedene Anbieter, unterschiedliche Antigene und Grenzwerte
2. IFT (indirekter Immunfluoreszenztest): verschiedene Anbieter, unterschiedliche Antigene

#### Schlussfolgerungen

*Candida*-Antigen- und -Antikörper-Nachweise sind zusätzliche Bausteine in der Diagnostik der invasiven Candidose. Mehrere positive Proben bzw. ein signifikanter Titeranstieg sind ein Hinweis auf eine invasive Candidose. Die Ergebnisse dieser Teste sind interpretierbar und nützlich bei Kenntnis des klinischen Bildes sowie kultureller und mikroskopischer Labor-Ergebnisse.

#### Literatur

Quindos G, Moragues MD, Ponton J. Is there a role for antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis? Rev Iberoam Micol 2004; 21: 10-14

Herent P, Stynen D, Hernando F, Fruit J, Poulain D. Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidosis. J Clin Microbiol 1992; 30: 2158-2164

Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassay for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: Useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. J Clin Microbiol 1999; 37: 1510-1517

#### Anschrift

PD Dr. med. Dagmar Rimek

Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz

Dezernat Medizinische Mikrobiologie

Nordhäuser Str. 74

99089 Erfurt

Tel.: 0361-7409125; Fax: 0361-7409111; email: dagmar.rimek@tllv.thueringen.de

#### **Protothekosen - Epidemiologie, Ätiologie und Klinik**

PD Dr. habil. Uwe Rösler

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig

Vertreter der Algengattung *Prototheca* sind die einzigen bisher bekannten Pflanzen, die bei Mensch und Tier klinische Infektionen verursachen können. Die durch Prototheken hervorgerufenen Krankheitsbilder werden dabei allgemein als Protothekosen bezeichnet.

1952 wurde die heterotrophe, farblose Alge *Prototheca* (*P.*) *zopfii* erstmals als Erreger einer Mastitis beim Rind identifiziert. Infektionen mit diesem Erreger wurden inzwischen weltweit beschrieben, und haben sich unter intensiven Haltungsbedingungen von einer anfangs sporadisch auftretenden Milchvieherkrankung zu einer endemischen Herdenerkrankung entwickelt. Die seltenen Infektionen beim Menschen werden hauptsächlich durch *P. wickerhamii*, die zweite pathogene Spezies verursacht, seltener wurde aber auch *P. zopfii* isoliert. Betroffen sind hauptsächlich immunsupprimierte Menschen, wie z.B. HIV- Patienten. Unterschieden werden hier die Haut- und Unterhautprotothekosen, Entzündungen der Schleimbeutel, Faszien und Sehnenscheiden und die seltener beschriebene systemische Protothekose. Ebenfalls beide Prototheken-Spezies finden sich bei den seltenen Protothekeninfektionen des Hundes. Die dabei oftmals auftretenden systemischen Erkrankungen erweisen sich hier meist als Therapie-resistent und enden in der Regel letal.

## **Prototheken**

### **Taxonomie**

1892 und 1894 werden Prototheken erstmals von KRÜGER beschrieben, der diese ins Reich der Pilze einordnete. Er begründete dies unter anderem mit der besonderen Fortpflanzungsform, der endogenen Sporenbildung. Doch fehlen den Prototheken andere pilztypische Fortpflanzungsformen wie das Myzel und die Arthrosporen, so dass sie bereits seit 1913 den Algen zugeordnet werden. Auch wenn eine Verwandtschaft zu den Grünalgen lange Zeit umstritten war, so ist dies jedoch durch neue molekularbiologische Untersuchungen als gesichert anzunehmen.

Nach der heute geltenden Taxonomie werden den Prototheken heute vier Spezies zugeordnet: *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, *P. ulmea* und *P. stagnora*, wobei nur *P. wickerhamii*, *P. zopfii* und *P. blaschkeae* als Krankheitserreger eine Rolle spielen. *P. zopfii* unterteilt man in zwei Genotypen, wobei lediglich *P. zopfii*-Genotyp 2 pathogen (Rind, Mensch, Hund) zu sein scheint.

### **Morphologie und Physiologie**

Prototheken sind ubiquitär vorkommende Saprophyten, mit einer Vorliebe für Habitate mit abgestorbenen, organischen Material von Mensch und Tier. Man findet sie in dem Saftfluß von Laubbäumen, Abwässern, Oberflächengewässern, Erdböden, aber auch aus Ölschlamm von Erdölraffinerien wurden sie isoliert. Darüber hinaus werden Prototheken als Teil der Normalflora des Darmes von Rind, Pferd und Schwein angesehen, weshalb man sie auch gehäuft in der Umgebung von landwirtschaftlichen Nutztieren antrifft.

Prototheken weisen eine hohe Tenazität auf. So bleiben sie in Trinkmilch, Graben- und Flusswasser, aber auch unter Trockenheit monatelang lebens- und infektiösfähig. In Rinder- und Schweinejauche sind sie bis zu 100 Tage lang kultivierbar.

Mikroskopisch stellen sich die Prototheken als einzellige, rund- ovale Zellen dar, deren Größe sich je nach Teilungsphase zwischen 3-30 µm bewegt. Die Zellwand ist je nach Alter ein bis dreischichtig, und besteht hauptsächlich aus Zellulose und Sporopollenin.

Die Fortpflanzung von *Prototheca* spp. erfolgt asexuell durch Teilung, wobei sich in der Mutterzelle (Sporangium) bis zu 30 Tochterzellen (Sporangiosporen oder Endosporen) bilden (Abbildung 2).

Prototheken wachsen auf Pilznährböden (Sabouraud-Glukose-Agar) in runden, cremeweißen bis beigen Kolonien, welche eine weiche Konsistenz und mattglänzende Oberflächen besitzen (Abbildung 1). Durch die morphologische Ähnlichkeit, dem Wachsen auf Pilznährböden und dem hefeähnliche Geruch kommt es nicht selten zu Verwechslungen von Prototheken mit *Candida* Spezies.



Abb. 1: Kulturmorphologie von *Prototheca zopfii* Genotyp 2 auf Sabouraud-Glukose Agar bei einer Bebrütungstemperatur von 37 °C und einer Inkubationszeit von 48 h.

### Diagnostik

Der korrekten Diagnostik kommt auf Grund der starken Therapie-Resistenz von Prototheken-Infektionen eine entscheidende Rolle zu. Die häufigste angewandte Methode ist hierbei die Erregeranzüchtung auf speziellen Nährmedien. Hier eignen sich die meisten auch in der Pilzdiagnostik eingesetzten Nährmedien, wie Sabouraud-Glukose- und Kimmigagar, sowie das Prototheken-Isolationsmedium (PIM) nach PORE. Dieses ist zur Unterdrückung der Begleitflora mit Antibiotika und Antimykotika versetzt. Weiterhin kann man sich zur kulturellen Protothekendifferenzierung auch kommerzieller Identifikationssysteme (z.B. Vitek<sup>®</sup>, API 20C<sup>®</sup>, BBL Crystal<sup>®</sup> und RapID Yeast Plus<sup>®</sup>) bedienen, die jedoch meist nur *P. wickerhamii* als Referenz in der Datenbank hinterlegt haben.

Sich an die Kultivierung anschließend, wird eine mikroskopische Untersuchung der verdächtigen Kolonien durchgeführt. Hierfür eignen sich die weit verbreiteten monochromatischen Vital-Färbungen mit Methyleneblau oder Laktophenolblau am besten (Abbildung 2). Dabei sind Prototheken, insbesondere deren Fortpflanzungsformen als runde- ovale, lichtbrechende Gebilde darstellbar.

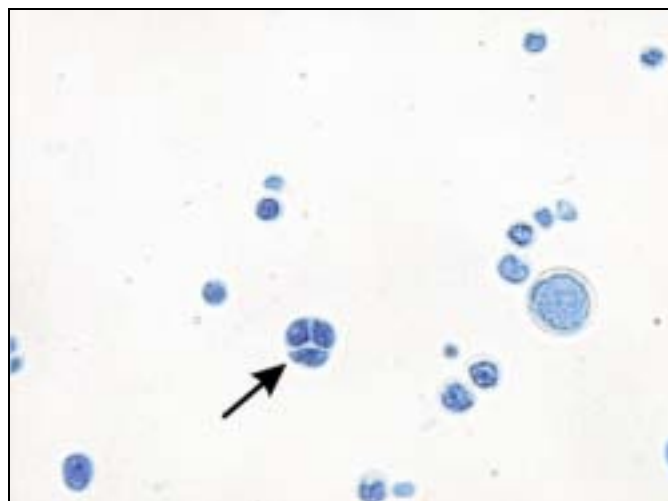


Abb. 2: Morphologie von *Prototheca zopfii* Genotyp 2 im Direktausstrich nach Laktophenolblau-Färbung. Wichtigstes diagnostisches Merkmal sind die spezifischen Fortpflanzungsformen (Pfeil), die Sporangiosporen im Sporangium.

Erschwerend für eine sichere kulturelle Diagnostik erweist sich allerdings die häufig intermittierende Erregerausscheidung (via Milch beim Rind, via Faeces beim Hund). Daher sind für eine erfolgreiche

Sanierung der betroffenen Milchvieh-Betriebe stets mehrere Untersuchungen notwendig, was den ohnehin beträchtlichen Aufwand einer kulturellen Protothekendiagnostik noch erhöht. Allerdings stehen für eine korrekte Diagnostik beim Rind inzwischen auch ein inhouse- ELISA zur Detektion von spezifischem IgA und IgG<sub>1</sub> im Milchserum zur Verfügung. Diese serologische Diagnostik ist insbesondere für die Diagnostik intermittierender Erregerausscheider gut geeignet. Im pathohistologischen Präparat einer Biopsieprobe, lassen sich Prototheken verlässlich mittels PAS- oder Grocott-Färbung darstellen, auch die Gomori-Silberimprägnation kommt hierfür in Frage. Die Hämatoxylin-Eosinfärbung dagegen erweist sich als ungeeignet. Eine verlässliche immunhistologische Diagnostik ist inzwischen ebenfalls etabliert (Abb. 2 & 3).

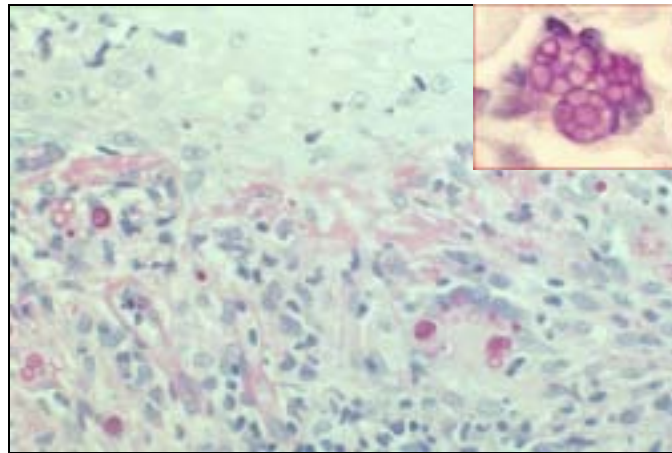


Abb. 2: *Prototheca* spec. im PAS-Präparat.

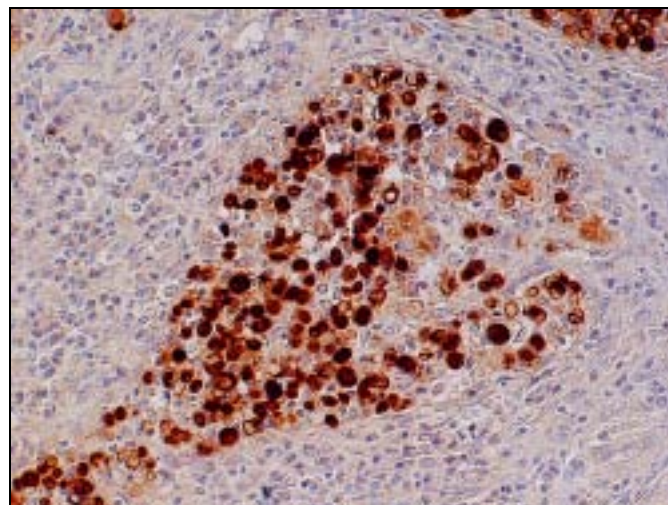


Abb. 3: Immunhistologisches Präparat einer Protothekenmastitis, angefertigt mit polyklonalem Anti-*P. zopfii* Genotyp 2- Hyperimmunserum und aufgenommen mittels Normarski-Interferenzkontrast, Vergrößerung 62,5x. Typisch sind die massiven Ansammlungen von Prototheken (braun) in den kleinen Milchgänge und Alveolen, die oft zum mechanischen Verschluss des Milch-ableitenden Systems führen. (In Zusammenarbeit mit Professor Dr. H.-A. Schon, Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig).

### 1. Protothekose des Menschen

**Ätiologie & Klinik:** Die Protothekeninfektion des Menschen ist eine sporadische, weltweit vorkommende Erkrankung, von der die meisten Fallberichte aus Asien und Nordamerika vorliegen. In den letzten Jahren wird eine steigende Inzidenz der Erkrankungsfälle beobachtet. Ausgelöst wird die Protothekose des Menschen in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle durch *Prototheca wickerhamii*, während *P. zopfii*-Infektionen (Genotyp 2) nur selten auftreten. Interessanterweise konnte allerdings

durch BLASCHKE-HELLMESSEN mehrfach *P. zopfii*, Variante III, aus Onychomykosen isoliert werden. Eines dieser Isolate aus einer Onychomykose konnte inzwischen phylogenetisch charakterisiert werden und wurde als Typus-Stamm der neu beschriebenen Spezies *P. blaschkeae* hinterlegt. Für die Entstehung der humanen Protothekosen werden prädisponierende Faktoren als eine Grundvoraussetzung angesehen. Neben iatrogen induzierten Protothekosen nach Glukokortikoid- oder Zytostatikaapplikation kommt hierbei in der jüngeren Vergangenheit besonders der Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) die größte Bedeutung zu. Häufigster Manifestationsort klinisch auffälliger Protothekosen ist neben der Haut die Bursa olecrani. Darüber hinaus wird aber besonders bei AIDS-Patienten vermehrt über systemische Protothekosen und Fälle mit viszerale Manifestationsorten berichtet.

**Ein Zusammenhang von humanen und tierischen Protothekosen wurde bisher noch nicht untersucht. Diskriminierende Testsysteme zur Klärung von möglichen Infektketten fehlen allerdings gänzlich.**

### **Therapie**

Aufgrund der stark ausgeprägten Antimykotika- und Antibiotika-Resistenzen sind die therapeutischen Möglichkeiten bei humanen Protothekosen beschränkt. Anders als beim Tier, wo die Prognose in der Regel infaust ist, gelingt es jedoch zumeist, durch Langzeittherapien mit Ketoconazol oder Amphotericin B eine Eliminierung des Erregers zu erreichen.

## **2. Protothekenmastitis des Rindes**

### **Ätiologie:**

Bei der Protothekenmastitis des Rindes handelt es sich um eine meist chronische, lokale Infektion der Milchdrüse unter Beteiligung der Euterlymphknoten, die wahrscheinlich nur durch *P. zopfii*-Genotyp 2 verursacht wird.

Dabei handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, wobei Faktoren wie Weide- oder Auslaufhaltung in Prototheken-belastetem Gelände, schlechte Melkhygiene, Hochlaktation, sowie Vorschädigung des Euters durch andere Mastitiserreger eine entscheidende Rolle spielen. Als Saprophyten können die Algen im Stall, der Stallumgebung, sowie aus dem Kot anderer Rinder, auch solcher ohne Protothekenmastitis, mit einem Prozentsatz von bis zu 70 % isoliert werden.

Die Infektion erfolgt galaktogen-aszendierend; auch Zitzenverletzungen werden als Eintrittspforte angesehen. Nach Eintritt der Erreger in das Hohlräumssystem des Euters erfolgt die Weiterverbreitung. Frischlaktierende Kühe sind besonders betroffen, denn die sezernierenden Alveolen bieten den Prototheken gute Vermehrungsbedingungen (Abbildung 3).

Darüber hinaus wird angenommen, dass auch die lymphogene und hämatogene Ausbreitung der Erreger im Euter eine gewisse Rolle spielen. So kann *P. zopfii* regelmäßig auch aus dem Euterlymphknoten erkrankter Rinder isoliert werden. Der Pathogenitätsmechanismus von Prototheken ist derzeit unbekannt. Es wird aber vermutet, dass sie in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten überleben und sich dort sogar vermehren können. Sie entgehen so der Elimination durch das Immunsystem. Als Erregerwirkung werden außerdem von *P. zopfii* gebildete Toxine vermutet, die das Alveolarepithel des Euters schädigen und damit die Ausbreitung der Algen begünstigen.

Die Fähigkeit in Makrophagen zu überleben und so der Phagozytose zu entgehen ist zudem eine mögliche Erklärung für die Chronizität der Protothekenmastitis. Dem Körper gelingt es zwar durch Abkapselung der Erreger, ein weiteres Ausbreiten zeitweise zu verhindern, allerdings gelingt die Abtötung der Prototheken nicht.

### **Klinik**

Die meist akut bis subakut beginnende Protothekenmastitis geht anschließend in ein chronisches Stadium über. Dies führt in der Regel zum vollständigen Funktionsverlust des betroffenen Euterviertels. Eine *restitutio ad integrum* bei einmal klinisch auffällig gewordenen Tieren ist die Ausnahme.

Im akuten Stadium ist das Euter von ballonartigem Aussehen und derber Konsistenz. Entzündungsmerkmale wie Rötung und Ödembildung sind dabei in der Regel aber nicht zu beobachten. Die Milchleistung sinkt in kurzer Zeit (24 h) rapide ab, teilweise versiegt sie völlig. Es ist ein Anstieg der somatischen Zellen in der Milch zu verzeichnen, Sekretveränderungen werden

hingegen anfangs selten bemerkt. Spätere Sekretveränderungen zeigen sich als schleimige- wässrige Konsistenz der Milch, welche häufig mit weißen oder gelblichen Ausflockungen versehen ist.

Das sich anschließende chronische Stadium der Protothekenmastitis ist bestimmt durch die Atresie der betroffenen Euterviertel mit deutlich tastbaren klein- oder großknotigen Gewebsveränderungen. Diese Veränderungen gehen mit einer ständigen Milchmengenabnahme, gefolgt vom völligen Funktionsverlust, und einer erhöhten Anfälligkeit für andere Krankheitserreger einher.

Als typisches Anzeichen einer endemisch vorliegenden Protothekenmastitis ist daher eine erhöhte Anzahl von Tieren mit einem oder mehreren atretischen Eutervierteln anzusehen. Der damit verbundene starke Milchrückgang verursacht in betroffenen Betrieben hohe wirtschaftliche Verluste.

### **Therapie**

Seit ihrer Erstbeschreibung wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Protothekenmastitis des Rindes zu bekämpfen und zu therapieren. Bisher erwiesen sich aber alle Therapiemaßnahmen als nicht wirkungsvoll oder nicht wirtschaftlich.

Um betroffene Rinderbestände zu sanieren, bedient man sich daher als dem Mittel der Wahl der Merzung aller infizierten Tiere, verbunden mit der kulturellen und serologischen Diagnostik. Die Optimierung von Melk- (Einsatz iodhaltiger Zitzendippmittel) und Haltungshygiene, ist derzeit als wichtigste Prophylaxemaßnahme bei der Bekämpfung der Protothekenmastitis auf Bestandesebene zu sehen.

### **3. Protothekose des Hundes und der Katze**

Neben der Protothekenmastitis des Rindes und den Protothekosen des Menschen, ist die des Hundes die am nächst häufigsten beschriebene. Allerdings differiert hier nicht nur das klinische Bild der Erkrankung, sondern auch beim Erregerspektrum gibt es Unterschiede. Während beim Rind ausschließlich *P. zopfii*-Genotyp 2 für das Krankheitsgeschehen verantwortlich gemacht wird, können beim Hund *P. zopfii* (GT2) und *P. wickerhamii* zu gleichen Teilen isoliert werden. Es liegen auch Fall-Berichte vor, wo innerhalb eines Krankheitsgeschehens beide Spezies isoliert wurden.

### **Klinik**

Anders als bei Rind und Mensch handelt es sich hierbei in den meisten Fällen um eine disseminierte Infektion, d.h. die Krankheit manifestiert sich in mehreren Organen. Hautprotothekosen werden beim Hund seltener beobachtet, häufiger dagegen chronisch, hämorrhagische Enteritiden, oft gefolgt von zentralnervösen Störungen mit Taubheit, Blindheit und Lahmheiten.

Pathomorphologische Veränderungen in Form von disseminierten, pyogranulomatösen Läsionen finden sich dabei in Retina, Darm, Konjunktiven, Nieren, Leber, Milz, Herz, Lunge sowie deren tributären Lymphknoten.

Bei der Katze ist bisher nur die Hautform der Protothekose aus Einzelfallbeschreibungen bekannt. Pathomorphologisch handelte es sich dabei ausschließlich um pyogranulomatöse Entzündungen. Als Erreger wurde hier stets *P. wickerhamii* isoliert.

### **Therapie**

Systemische Therapien blieben bisher beim Hund meist ohne Erfolg. Behandlungsversuche mit Antimykotika (Amphoterasin B, Ketokonazol) und Antibiotika zeigen, anders als beim Menschen, bisher nicht die gewünschte Wirkung, so dass die betroffenen Hunde entweder verenden oder euthanasiert werden müssen.

Weiterführende Literatur bei den Verfassern

Anschrift:

PD Dr. habil. Uwe Rösler;

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen,  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig,

An den Tierkliniken 1

04103 Leipzig

Tel.: 0341 9738153

Fax: 0341 9738198  
email: roesler@vetmed.uni-leipzig.de

## Mikroskopierkurs - Differenzierung von häufigen und seltenen Sproßpilz-Arten

Jürgen Herrmann, Dagmar Rimek & Pietro Nenoff

Laboratorium für medizinische Mikrobiologie, Mölbis  
Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Dezernat Medizinische Mikrobiologie, Erfurt

Da einige Sproßpilzarten die Fähigkeit besitzen, sich bei 37°C zu vermehren, sowie weitere Pathogenitätskriterien erfüllen, gehören sie zu den fakultativ-pathogenen Erregern, oder auch opportunistischen Sproßpilzen. Zur Infektion kommt es durch Aktivierung der die eigene Schleimhaut besiedelnden Sproßpilze, daneben kann auch eine Übertragung durch direkten Kontakt erfolgen (Schmierinfektion, nosokomiale Infektion von immunsupprimierten Patienten/Risikopatienten im Krankenhaus; aber auch infolge sexueller Übertragung). Krankheitsbilder sind der Soor des Orointestinaltraktes, im Genitaltrakt der Frau eine Vaginitis (Kolpitis) bzw. beim Mann die Balanoposthitis.

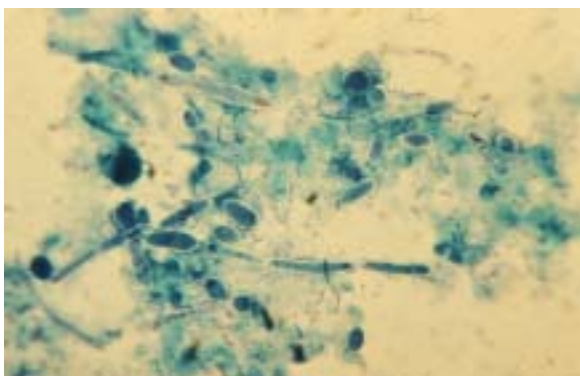
Von nässenden Läsionen der Haut sowie den verdächtigen Schleimhautarealen entnimmt man mit einem sterilen Wattetupfer Abstriche. Außerdem werden Blutkulturen, Urin, Stuhl, Sputum etc. auf Sproßpilze untersucht.

### Mikroskopische Beurteilung

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

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

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



Methyleneblaufärbung eines Trachealsekretabstriches: ovale Blastosporen und Pseudomyzel von *C. albicans*

Es lassen sich folgende Aussagen anhand des mikroskopischen Präparates treffen:

- Sproßpilzzellen vorhanden/nicht vorhanden
- keine Gattungs- oder Artidentifizierung
- Pilz (pseudo-)hyphen können prinzipiell auch von Dermatophyten oder Schimmeln stammen

Kultureller Sproßpilznachweis

Die beimpften Nährmedien werden bei 36°C bebrütet und am nächsten Tag und noch einmal nach 48 h auf Pilzwachstum kontrolliert. Es ist günstig, dem Sabouraud-Glukose-Nährboden Antibiotika zuzusetzen, bzw. ein mit Antibiotika versetztes Fertignährmedium zu verwenden. So lässt sich störendes Bakterienwachstum weitgehend verhindern.

Dennoch wachsen gelegentlich einige Bakterienarten, die resistent gegenüber den Breitspektrumantibiotika (Chloramphenicol, Gentamicin) im Nährboden sind, durch. Deshalb ist der weniger geübte Mykologe gut beraten, zweifelhafte Kolonien (in physiologischer Kochsalzlösung verrieben) mittels eines einfachen Deckglaspräparates zu untersuchen. Man kann auf diese Weise sehr leicht Bakterien von den charakteristischen größeren, sprossenden Hefezellen (Blastosporen) unterscheiden.

Wichtige Identifizierungskriterien für Sproßpilze sind u. a.:

- Bildung von sexuellen oder asexuellen Sporen
- Beurteilung der Makromorphologie (Koloniewachstum, Koloniefarbe)
- Beurteilung der Mikromorphologie (Wachstum auf Reis-Agar)
- Stoffwechsellösungen
- Biochemische Differenzierung (Assimilation und Fermentation von Kohlehydrat- und Stickstoffquellen)
- Wachstumsfähigkeit bei 37°C

Von den mehr als 300 Sproßpilz-Arten, darunter allein ca. 200 *Candida*-Spezies, sind letztlich nur ca. zehn Spezies medizinisch bedeutsam und müssen differenziert werden: an erster Stelle steht *C. albicans*, gefolgt von *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* und *C. kefyr* (früher *C. pseudotropicalis*). Die meisten *Candida*-Spezies bilden auf Sabouraud-Agar wachsweiße, weiße und konvexe Kolonien, *C. krusei* dagegen hat flache, trockene, matte, graue Kolonien mit einem Pseudomyzelsaum. Auch die Rauform von *C. parapsilosis* ist bereits in der Primärkultur an den kraterförmigen, meist matten Kolonien mit unregelmäßigem Saum und Pseudomyzel zu erkennen.

Makroskopische Merkmale der Sproßpilze

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

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

Ausnahmen sind:

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

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

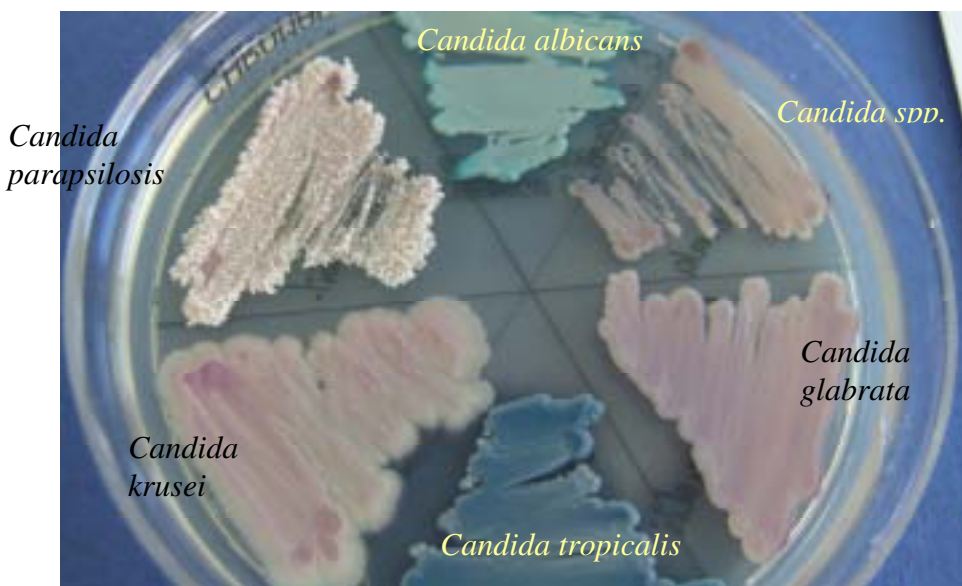
*Rhodotorula spp.*: rote Sproßpilze = apathogen

Chrom-Agar zur Sproßpilzdifferenzierung

Heute wird *C. albicans* durch Überimpfung auf einen sog. Chrom-Agar, z. B. CHROMagar *Candida*, und nachfolgender Bebrütung bei 36°C bestimmt. Die Kolonien beginnen sich bereits nach 4 h grünlich zu verfärben. Mit einigen dieser Chrom-Agar-Nährmedien können weitere *C.*-Arten aufgrund ihrer charakteristischen Färbung differenziert werden, so z. B. *C. glabrata* (violett) und *C. tropicalis* (blau).



Albicans-ID-Nährmedium (bioMérieux Nürtingen): *Candida albicans*-Kolonien zeigen Blaufärbung, *Candida* spp. sind weiß bis beige und müssen weiter differenziert werden



Chrom-Agar Candida (BD Becton Dickinson, Heidelberg)

#### Stoffwechsellösungen der Sproßpilze

#### Empfindlichkeit gegenüber Cycloheximid

Cycloheximid (=Actidion<sup>®</sup>, aus *Streptomyces noursei* isoliert) ist ein Hemmstoff des Wachstums von Schimmelpilzen und auch einiger Sproßpilze. Im Nährboden sind 400 (bis 500) µg Cycloheximid/ml enthalten.

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

*Candida parapsilosis*  
*Candida glabrata*  
*Candida krusei*  
*Saccharomyces cerevisiae*  
*Cryptococcus neoformans* et *Cryptococcus* species

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

*Candida albicans*  
*Candida kefyr*  
*Trichosporon cutaneum*

c) Actidion-Empfindlichkeit variabel:

*Candida guilliermondii*

## *Candida tropicalis*

### Mikroskopische Differenzierung von Sproßpilzen

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

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

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

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

Das Reis-Nährmedium erlaubt eine orientierende Bestimmung einiger medizinisch bedeutsamer Sproßpilzarten. Reis-Agar ist ein Mangelmedium, auf welchem die Sproßpilze innerhalb von 24 h bzw. 48 h typische, im Einzelfall auch artspezifische Merkmale herausbilden. Die Reis-Agarplatte sollte völlig klar, durchsichtig und dünn gegossen sein. Wer mit der Qualität kommerzieller Reis-Nährmedien nicht zufrieden ist, kann diesen Nährboden auch selbst herstellen. 20 g Naturreis werden in 1 l Leitungswasser über Nacht bei Raumtemperatur gequollen. Am nächsten Tag wird diese Suspension für 60 min bei 60°C im Wasserbad erhitzt, danach der Reis durch Mull vom Sud abgetrennt, das Filtrat auf pH 7,2-7,4 eingestellt, 20 g Agar-Agar dazugegeben, mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, im Autoklav für 15 min bei 121°C sterilisiert und portioniert in Erlmeyerkolben zur Zwischenlagerung abgefüllt. Man gießt frische Reisplatten nach Bedarf, die Nährbodenhöhe sollte nur 2-3 mm betragen. Auf einer Reis-Agarplatte können gleichzeitig sechs Sproßpilzstämmen aufgetragen werden. Die Beimpfung erfolgt mit drei Impfstrichen, und diese werden mit einem sterilen Deckglas abgedeckt. Bereits nach 24 (-48) h Bebrütung bei 30°C wird zunächst bei 100-facher, dann 400-facher Vergrößerung, mikroskopiert. Neben der Chlamydosporen-Bildung, die für *C. albicans* und *C. dubliniensis* artspezifisch ist, wird auf die Blastosporen-Beschaffenheit und die Art und Form der Pseudomyzel-Bildung geachtet. Mit einiger Erfahrung können auf diese Weise die klinisch relevanten Sproßpilzarten differenziert werden.

### Biochemische Differenzierung von Sproßpilzen

Eine entsprechend EBM abzurechnende Sproßpilzdifferenzierung erfordert allerdings die weitergehende biochemische Prüfung, d. h. die Bestimmung der StoffwechsellLeistungen mittels Assimilation und Fermentation. Hierbei wird die Wachstumsfähigkeit bei Vorhandensein von einzelnen Wachstumsfaktoren (Zucker, Kohlehydrate, Salze, weitere Chemikalien) kontrolliert. Wenn die benötigten Testblättchen selbst hergestellt werden, tropft man 1 %-ige Lösungen der jeweiligen Wachstumsfaktoren auf ca. 5 mm große Testblättchen, legt diese auf den vorab beimpften Nährboden zur Assimilationsprüfung (ohne Zuckeranteil) und bebrütet bei 30°C. Die Ablesung und Spezieszuordnung erfolgt entsprechend dem in untenstehender Tabelle gezeigten Beispiel. Einfacher, allerdings kostenintensiver, sind die kommerziell beziehbaren Bestimmungs-Testkits für Sproßpilze. Nach Bebrütung bei 30°C über 24-48 h werden aus den bewachsenen Kavitäten manuell oder automatisch Zahlencodes gebildet, die zu den gesuchten Sproßpilzspezies führen.

Die biochemische Differenzierung umfasst die Beurteilung von Assimilation (Verwertung) und Fermentation (Spaltung) von Kohlehydrat-Quellen (Glukose, Galaktose, Saccharose, D-Xylose, Inosit u. a.) sowie von Stickstoff-Quellen (Pepton, KNO<sub>3</sub>).

Prinzip der Durchführung der "bunten" Reihe:

- Sproßpilzsuspension in Vertiefungen pipettieren (darin sind Substrate, z. B. Kohlehydrate)
- 24 - 48 h Inkubation
- Wachstumsbeurteilung (Färbung bzw. Trübung)

- Zahlen-Code (8-stellig) aufstellen = Index
- Auswertung: Ablesen der Sproßpilzart in Tabelle, Buch oder Software

#### Assimilationsverhalten wichtiger *Candida*-Arten

	Glukose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Trehalose	Celibiose
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+/-	+	-	-	+	+/-
<i>C. kefyr</i>	+	+	+	-	+	+	-	+

#### Bezeichnung einiger kommerziell beziehbarer Sproßpilz-Differenzierungstestkits

Testsystem	Anzahl Reaktionen	Firma	PLZ und Ort
Api 20C Aux	20	bioMérieux	72602 Nürtingen
Api ID32C	32	bioMérieux	72602 Nürtingen
Vitek YBC	29	bioMérieux	72602 Nürtingen
Candifast	8	Innogenetics	46359 Heiden
Fungichrom (1)	16	Innogenetics	46359 Heiden
Micronaut Candida	21	Virotech	65428 Rüsselsheim
Mycotube	8	BD (Becton Dickinson) Diagnostics	69126 Heidelberg
RapID YEAST Plus	18	Oxoid	46467 Wesel

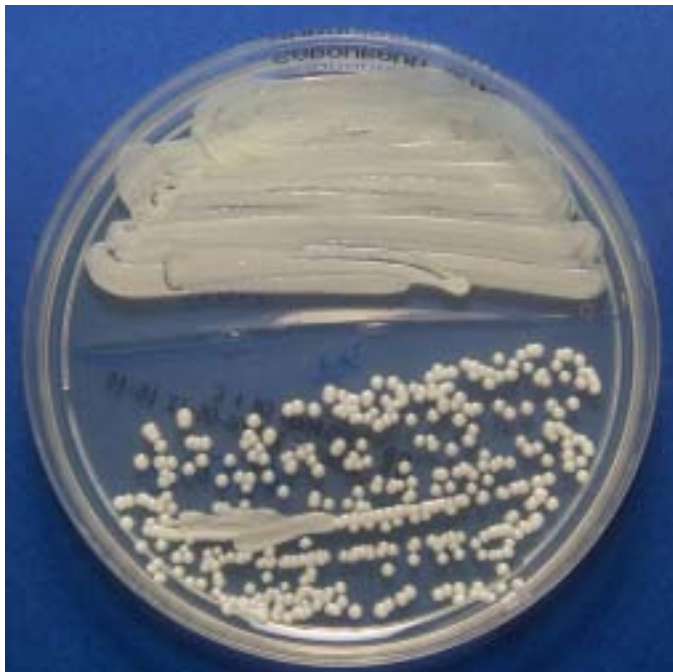
(1) in Vorbereitung

#### Differenzierung von *Candida albicans* – *Candida dubliniensis* und *Candida africana*

PD Dr. med. Dagmar Rimek

Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Dezernat Medizinische Mikrobiologie, Erfurt

*C. albicans* ist mit Abstand die häufigste aus klinischem Material isolierte Spezies. *C. dubliniensis* wurde 1995 bei HIV-Patienten in der Mundhöhle beschrieben, mittlerweile aber bereits aus einer Reihe klinischer Materialien isoliert. *C. africana* wurde 1995 primär bei afrikanischen Patientinnen aus dem Genitaltrakt isoliert, 2001 als neue Art vorgeschlagen und inzwischen auch bei deutschen Patienten gefunden. Ob es sich bei *C. africana* um eine eigene Spezies oder um eine Variante von *C. albicans* handelt ist noch ungeklärt.



*Candida albicans* weist meist glatte, beige erscheinende, gewölbte Kolonien auf

Bei schnell durchzuführenden Identifizierungsreaktionen, die häufig zunächst zur Sproßpilzidentifizierung durchgeführt werden, ergeben *C. albicans*, *C. dubliniensis* und auch *C. africana* weitgehend identische Ergebnisse. Es sind

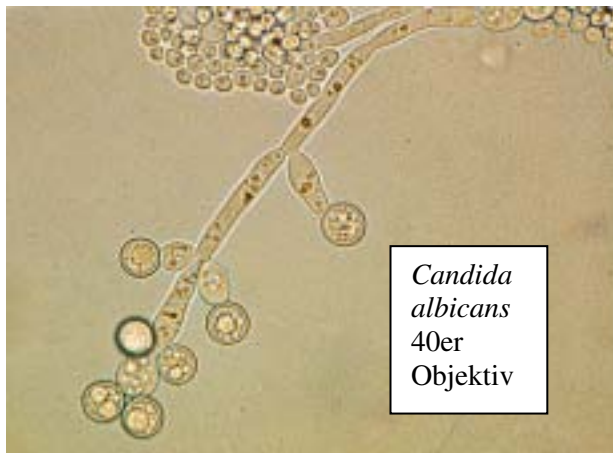
dies: Farbbildung auf chromogenen Medien und positiver Keimschlauchtest. Zur weiteren Differenzierung dieser drei Spezies müssen mehrere Identifizierungsreaktionen durchgeführt werden, wie z.B.: Chlamydosporenbildung auf Reis-Tween 80-Agar, Wachstumsverhalten bei 42°C und 45°C, Wachstum in HR-Bouillon mit 9,5 % NaCl, Wachstum auf Staibagar und Kohlenhydratassimilation-Teste.

#### *Keimschlauchtest auf Mueller-Hinton-Agar*

Eine Mueller-Hinton-Agarplatte wird in Sektoren mit den Teststämmen beimpft, die Impfstriche werden mit einem Deckgläschen bedeckt, und die Platte wird für 2 h bei 37°C bebrütet. *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. africana* bilden in dieser Zeit typischerweise sogenannte Keimschläuche (= Filamente, die nicht eingeschnürt sind an der Stelle, an der sie aus der Hefezelle austreten).

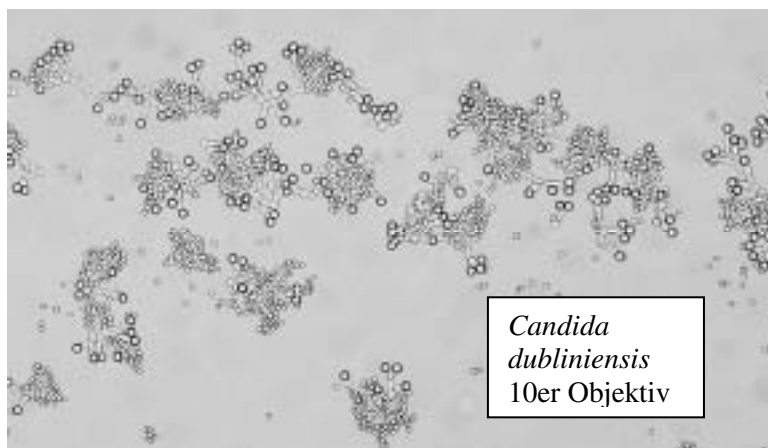
#### *Mikromorphologische Untersuchung auf Reis-Tween 80-Agar*

Es wird das Pseudomyzel und die Chlamydosporenbildung beurteilt. *C. albicans* bildet typischerweise langes Pseudomyzel mit einzelnen endständigen Chlamydosporen, *C. dubliniensis* dagegen kürzeres Pseudomyzel mit mehreren endständigen, traubenartig angeordneten Chlamydosporen. *C. africana* bildet keine Chlamydosporen und die Pseudomyzelbildung ist verzögert.



Mikroskopie von *Candida albicans* auf Reis-Agar

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



#### *Mikromorphologie auf Staibagar*

Es wird eine Staibagarplatte mit dem Teststamm beimpft und für 48–72 h bei 30°C bebrütet. Die Kolonieform wird nach 48 und 72 h makroskopisch sowie mikroskopisch bei 100- bis 200-facher Vergrößerung beurteilt. *C. albicans* bildet typischerweise glatt-begrenzte, glänzende Kolonien, *C. dubliniensis* raue Kolonien mit Randhyphen und Chlamydosporenbildung.

#### *Temperaturverhalten*

Drei Sabouraud-Glucose-Platten werden mit dem Teststamm mit einem fraktionierten Ausstrich beimpft. Eine Sabouraud-Glucose-Platte wird bei 37°C, die zweite bei 42°C, die dritte bei 45°C für

24-48 h inkubiert. Nach 24 und 48 h wird das Wachstum der drei Platten beurteilt und verglichen. Die meisten Stämme von *C. albicans* wachsen gut bei allen drei Temperaturen, *C. dubliniensis* wächst gut bei 37°C, bei 42 °C hingegen stark reduziert bzw. gar nicht und bei 45°C gar nicht, *C. africana* wächst bei 37°C, aber nicht bei 42°C und 45°C.

#### Wachstum in HR-Bouillon mit 9,5 % NaCl

Ein Röhrchen mit HR-Bouillon mit 9,5 % NaCl wird mit dem Teststamm beimpft und für 24 - 48 h bei 37°C bebrütet. Nach 24 und 48 h wird das Wachstum in der Bouillon beurteilt. Trübung und / oder Bodensatz bedeutet Wachstum. *C. albicans* wächst in dieser Bouillon, *C. dubliniensis* nicht.

#### Kohlenhydratassimilation

Kohlenhydratassimilationsteste werden üblicherweise mit kommerziellen Testsystemen durchgeführt. Moderne Systeme können zumindest zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* differenzieren (Datenbank kontrollieren). Biochemisch abweichende Reaktionen sollten zu weitergehenden Untersuchungen auf *C. africana* veranlassen.

#### Latexagglutination

Für die Identifizierung von *C. albicans* und *C. dubliniensis* sind kommerzielle Latexagglutinationsteste verfügbar (Bichro-Latex Albicans, Bichro-Dubli Fumouze, Vertrieb Fa. Biotrin). Diese beruhen auf monoklonalen Antikörpern und besitzen eine hohe Sensitivität und Spezifität.

Zusammenstellung phänotypischer Methoden zur Differenzierung von *C. albicans* – *C. dubliniensis* – *C. africana*

Test	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. africana</i>
ChromagarCandida 48 h, 37 °C (nur Primärisolat)	grün	dunkelgrün (60%)	hellgrün
Keimschlauchtest (MH-Agar, 2 h 37°C)	+	+	+
	(lange, schlanke Filamente)	(breite, kurze Filamente)	
Chlamydosporen auf Reis-Tween 80-Agar (48 h, 25°C)	+	++ (traubenförmig) (kurzes Pseudomyzel)	- (Pseudomyzel verzögert)
Wachstum 42°C, 48 h	+	(+) oder -	-
Wachstum bei 45°C, 48 h	+	-	-
Wachstum in HR-Bouillon mit 9,5 % NaCl, 24-48 h	+	-	-
Staibagar (Negersaat) 30°C, 48-72 h	glatt-begrenzte, glänzende Kolonien	raue Kolonien, Randhyphen Chlamydosporen	
<u>Zucker-Assimilation (ID 32C):</u>			
Xylose (XYL)	98 %	3 %	+
α-Methyl-D-Glukosid (MDG)	98 %	0 %	-/+
Lactat (LAT)	96 %	10 %	-
Trehalose (TRE)	97 %	11 %	-
N-Acetylglucosamin (NAG)	100 %	90 %	-

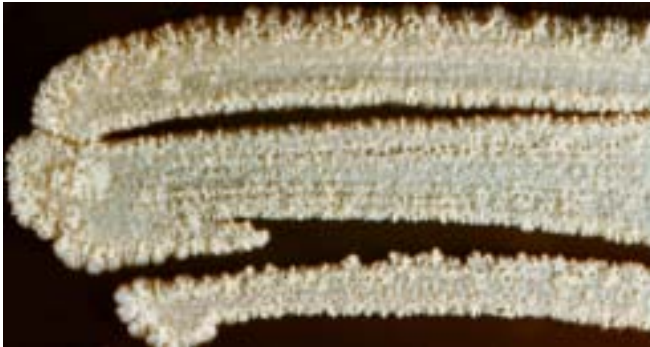
#### Literatur

Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. J Clin Microbiol Rev 1998; 36: 329-334

Tietz HJ, Hopp M, Schmalreck A, Sterry W, Czaika V. *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? Mycoses 2001; 44: 437-445

### ***Candida parapsilosis***

*Candida parapsilosis* ist makroskopisch an den rauen, faltigen Kolonien erkennbar. Es gibt darüber hinaus auch Stämme mit glatter Oberfläche.

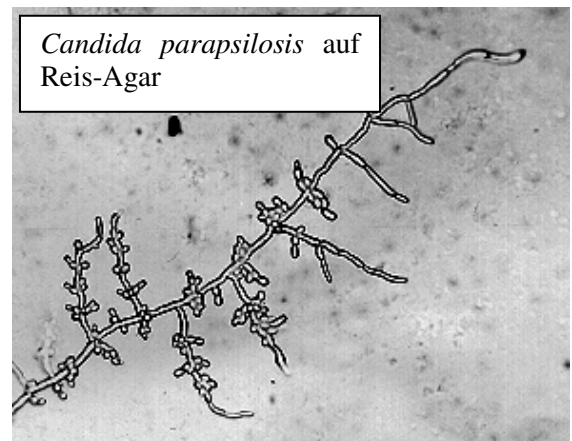
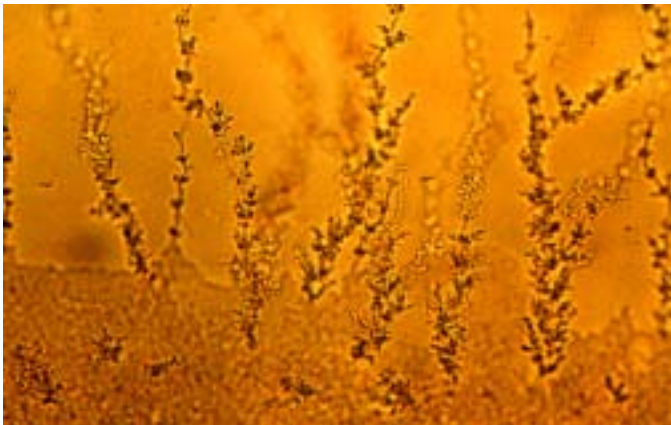


*Candida parapsilosis* auf Sabouraud-Glukose-Agar

#### Mikroskopie auf Reis-Agar

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

*C. parapsilosis* bildet typisches Pseudomyzel, charakterisiert durch längliche, wurstförmig aneinander gereihte Blastosporen. Vereinzelt treten im Pseudomyzel Zellen von doppelter Länge und Breite auf (sog. Riesenmyzel). An den Enden der einzelnen Pseudomyzelien haften zumeist ein bis zwei kleine Sproßzellen.

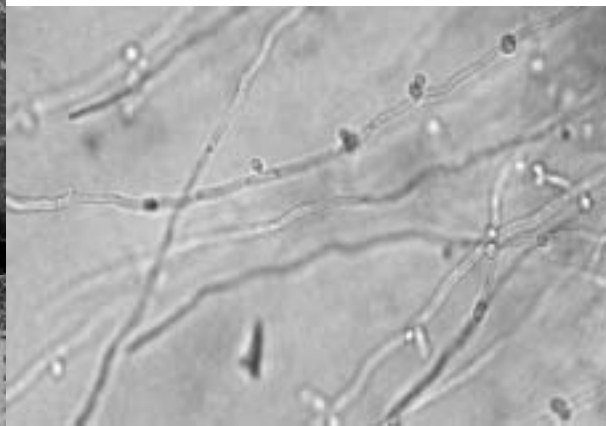
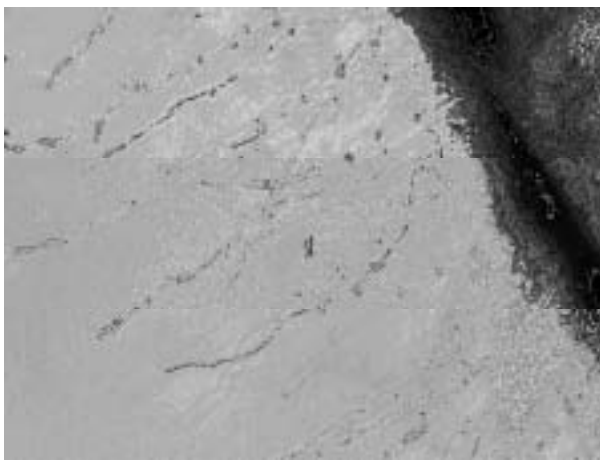


### ***Candida tropicalis***

*Candida tropicalis* auf Sabouraud-Glukose-Agar



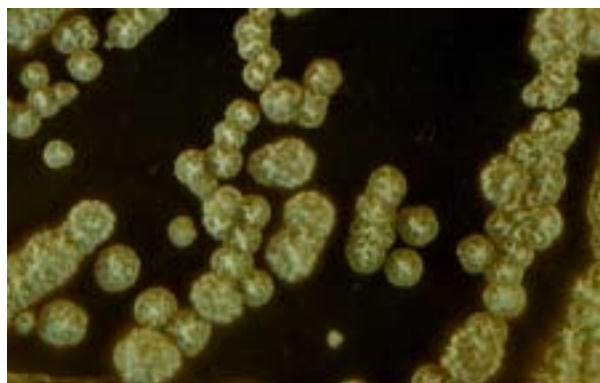
*Candida tropicalis* bildet auf Reis-Agar stark verzweigtes, auffällig langes Pseudomyzel mit vielen, mittelgroßen Sproßzellen an den Verzweigungen.



Das raumgreifende Pseudomyzel von *C. tropicalis* wird schnell entwickelt und reicht weit in die Reisplatte hinein. Kleine Sproßzellen sitzen nicht nur an den Enden der einzelnen Pseudomyzelien, sondern umgeben diese auch mittig.

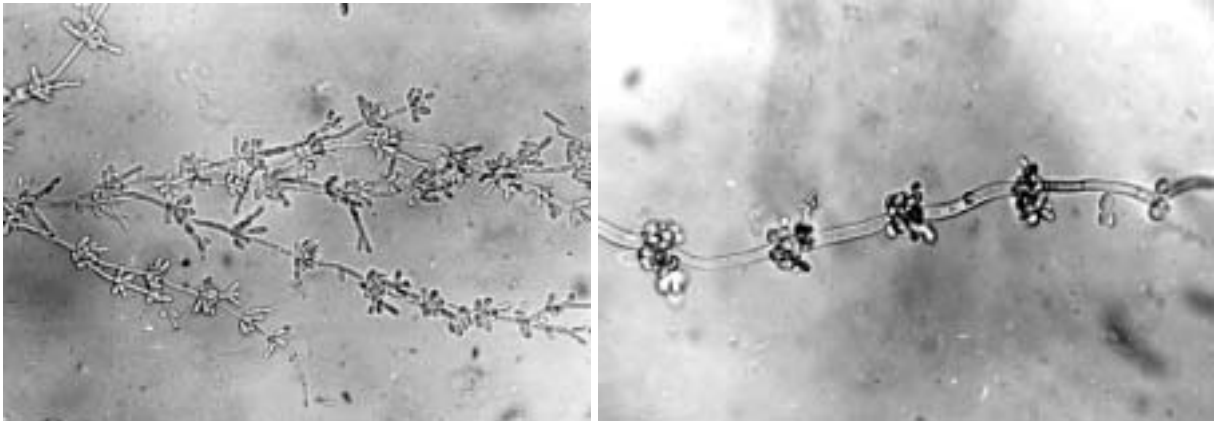
### ***Candida krusei***

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



*Candida krusei* auf Sabouraud-Glukose-Agar

Auf Reis-Agar sind sehr große, längliche, manchmal balkenförmige Zellen und Pseudomyzel erkennbar. Die größten Sproßzellen und ein auffällig großes Pseudomyzel werden von *C. krusei* gebildet. Die Zellgröße schwankt zwischen 3-6 x 6->20 µm. An den langen, manchmal



balkenförmigen Pseudomyzelien können die Blastosporen wirtelförmig, wie die Zweige eines Bäumchens, angeordnet sein, bzw. manchmal aber auch lose und in Haufen gelagert das Pseudomyzel umgeben.

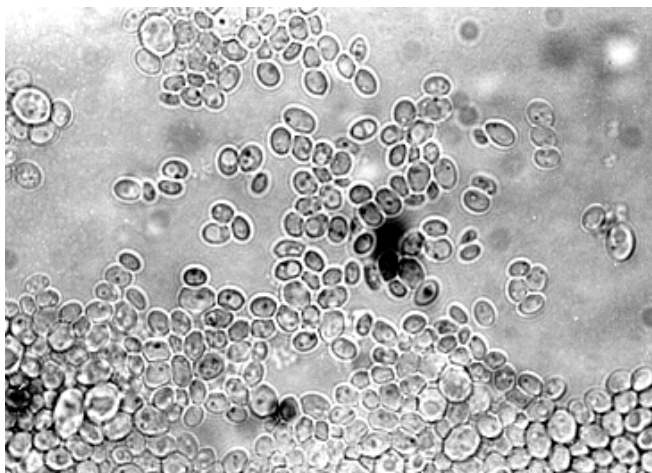
### *Candida glabrata*

*Candida glabrata* zeichnet sich durch Kolonien mit zentraler Erhebung aus.

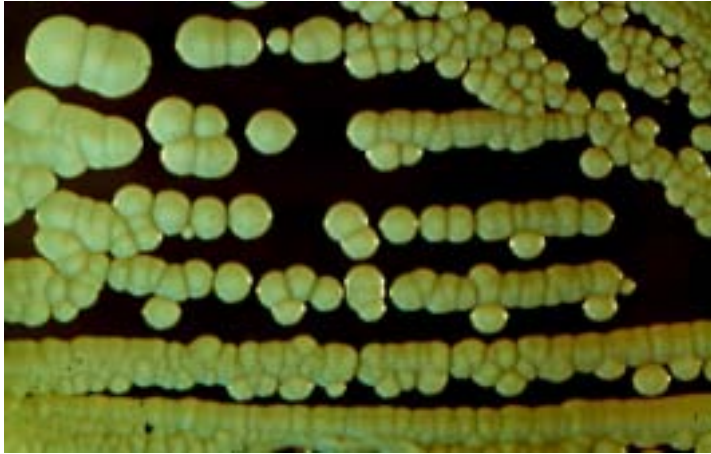


*Candida glabrata* Urinkultur

Mikroskopie auf Reis-Agar



*C. glabrata* bildet kein Pseudomyzel. Typisch sind kleine, runde bis leicht ovale Sproßzellhaufen. Das mikroskopische Bild wirkt gleichmäßig, da zwischen den Zellen kaum Größenunterschiede festzustellen sind.

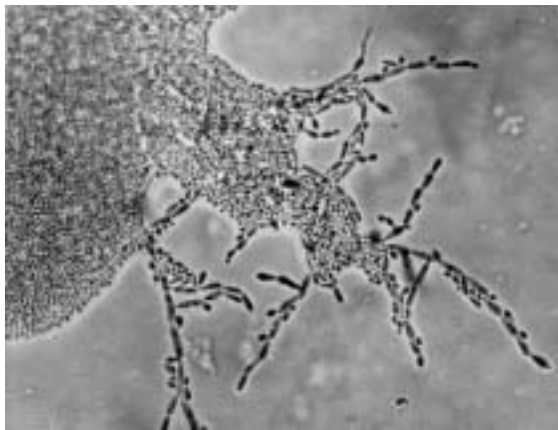


*Candida guilliermondii*

*Candida guilliermondii* auf Sabouraud-Glukose-Agar

#### Mikroskopie auf Reis-Agar

Kleine, oft längliche Sproßzellen wachsen gemeinsam mit kurzem, verzweigten Pseudomyzel, welches aus den Haufen der Blastosporen sprießt. Das mikroskopische Bild des Blastosporenhafens von *C. guilliermondii* ähnelt dem von *C. glabrata*. Der Zellverband wirkt ähnlich klein und gleichmäßig; allerdings entwickelt sich häufig, im Unterschied zu *C. glabrata*, aus dessen Mitte, neben normal ausgebildetem, manchmal ein nur angedeutetes bzw. verkümmertes Pseudomyzel, welches am Kolonierand oft ganz ausbleibt.



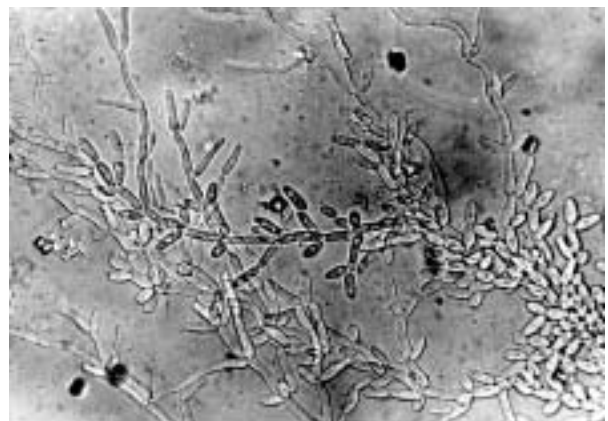
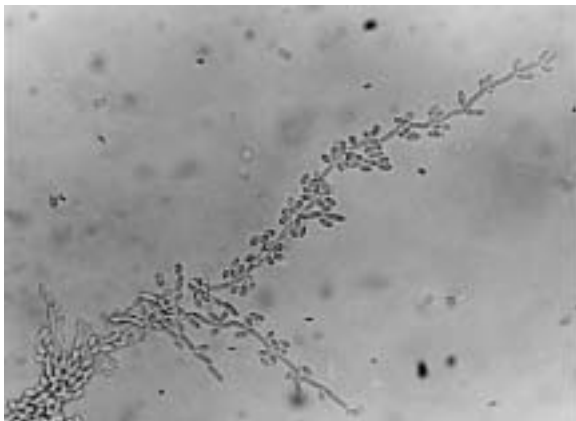
*Candida guilliermondii* auf Reis-Agar

#### *Candida kefyri* (früher: *pseudotropicalis*)

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

#### Mikroskopie auf Reis-Agar

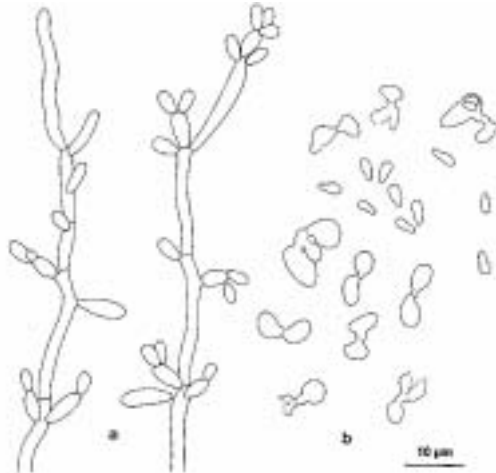
Längliche Sproßzellen, etwas kleiner als die von *Candida krusei*. *C. kefyri* besitzt große, längliche Sproßzellen, auch im Pseudomyzel, ähnlich *C. krusei*, aber im Unterschied zu letzterem liegen die



Blastosporen häufig lose und ungeordnet am Pseudomyzel, manchmal jedoch auch parallel am Pseudomyzel angeordnet.

### *Candida lusitanae*

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



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

Mikroskopie Reis-Agar: Gut entwickeltes Pseudomyzel mit Ketten von Blastosporen auf Reis-Nährboden.

Abbildung aus De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2<sup>nd</sup> edition 2000, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands & Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

### *Candida ciferrii*

Auf Sabouraud-Glukose-Agar bei 36 und 28°C weiße, konkave, glänzende Kolonien, ab dem 3. Tag visuell sichtbares Pseudomyzel; auf Chromagar Candida BD blauer Zellrasen; auf Reisagar bei 28°C nach 24 h raumgreifendes Pseudomyzel mit Blastosporen endständig und mittig angeordnet, erinnernd an Pseudomyzelzellen von *C. tropicalis*; gutes Wachstum auf Dermatophytenagar BD (0,5 g Cycloheximid/l), bei 36°C als faltige (gekräuselte), weiße bis beige Kolonien.

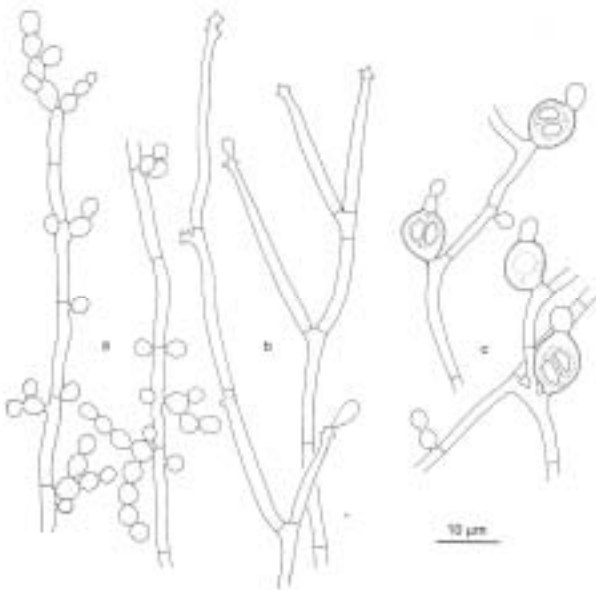
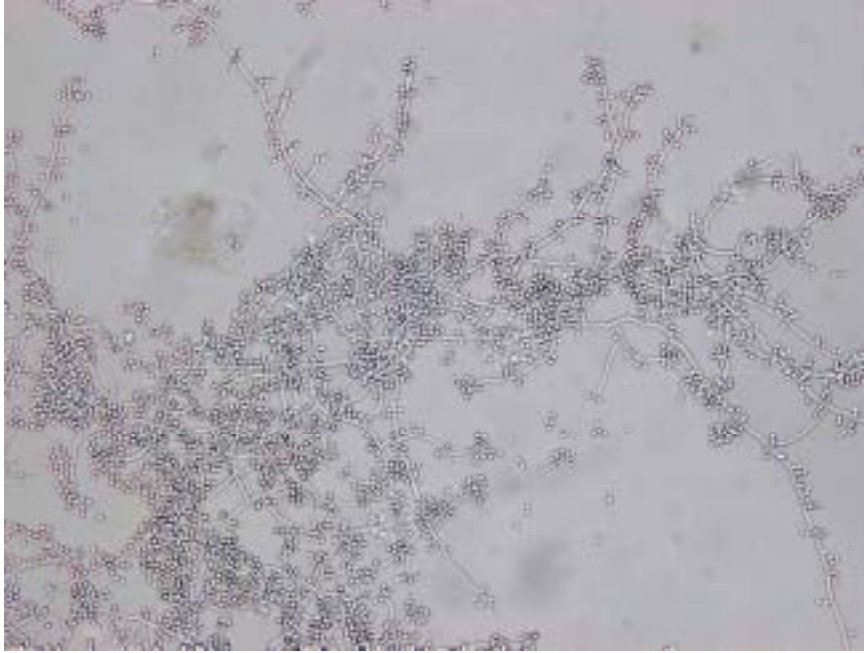


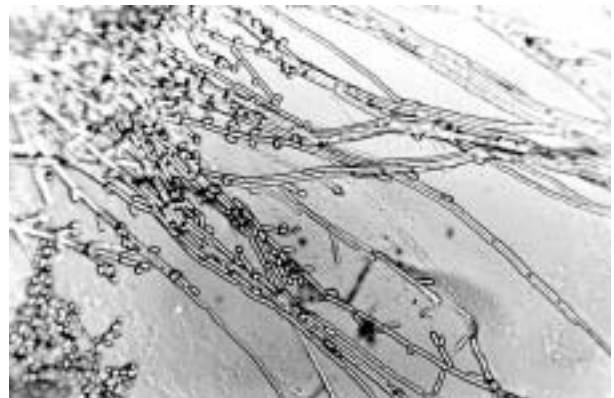
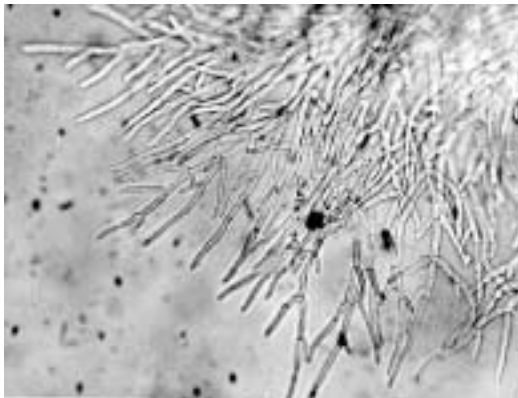
Abbildung aus De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2<sup>nd</sup> edition 2000, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands & Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain



*Candida ciferrii* auf Reis-Agar

***Candida lipolytica***

*Candida lipolytica* ist ein Hefepilz, der auf flüssigen, jedoch meist auch auf festen Nährböden eine



stark gefaltete, feste, zähe Haut ausbildet.

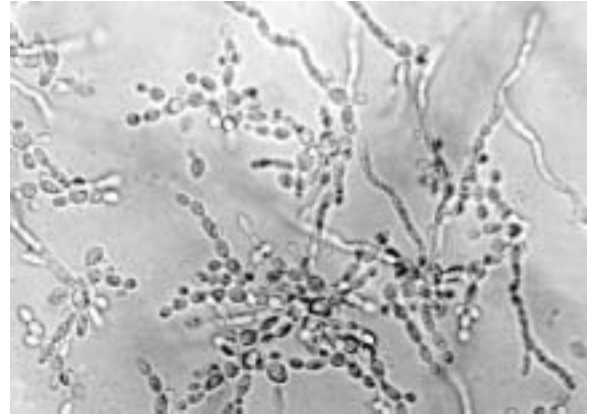
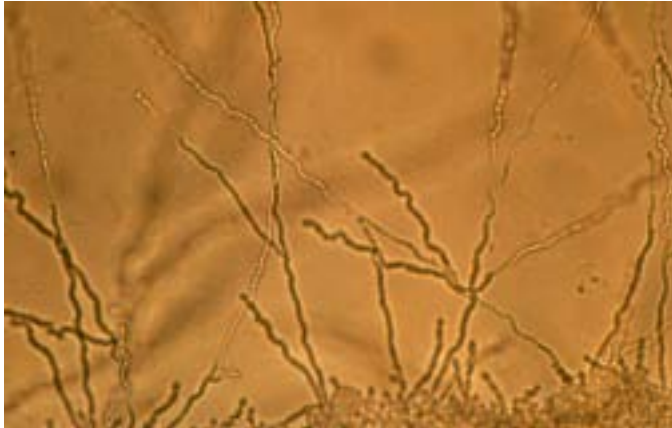
*Candida lipolytica* auf Reis-Agar: Lange Pseudohyphen und Blastosporen, die einfach oder gepaart sind, nodal (an den Septierungen) oder internodal an den Hyphen inserieren.

***Trichosporon cutaneum***

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



*Trichosporon cutaneum* auf Sabouraud-Glukose-Agar gefaltete, zähe Kolonien



*Trichosporon cutaneum* auf Reis-Agar

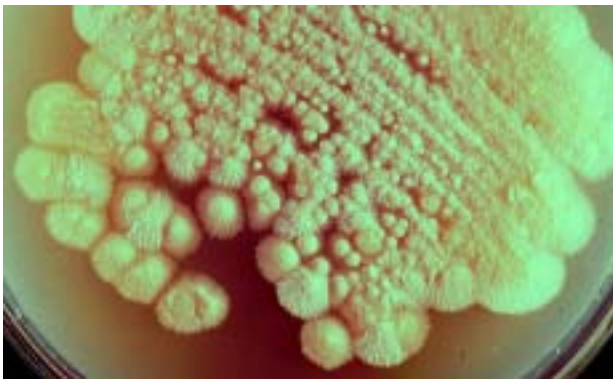
Pseudomyzel, Sproßzellen und Arthrosporen sind auf Reis-Agar erkennbar. Arthrosporen (Gliederstücke) entstehen durch Teilung einer Hyphe. Sie sind oft zick-zack-artig angeordnet.

### ***Geotrichum (Trichosporon) capitatum***

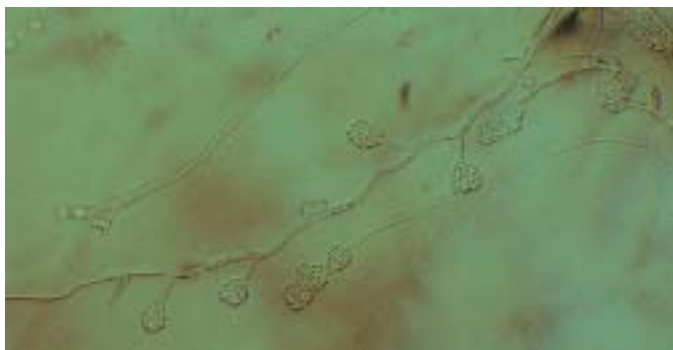
synonyme Bezeichnung: *Blastoschizomyces capitatus*

Makroskopie

siehe *Trichosporon cutaneum*



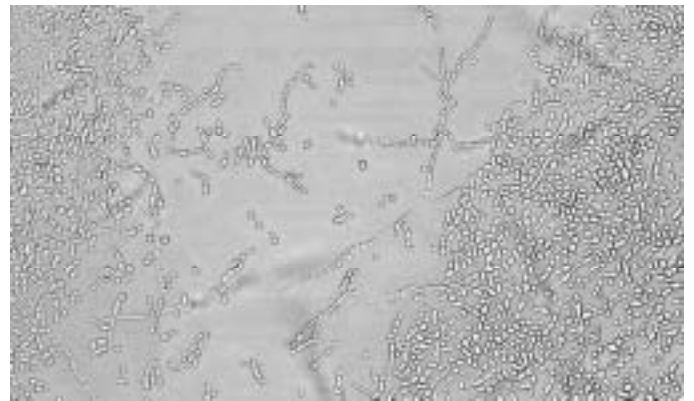
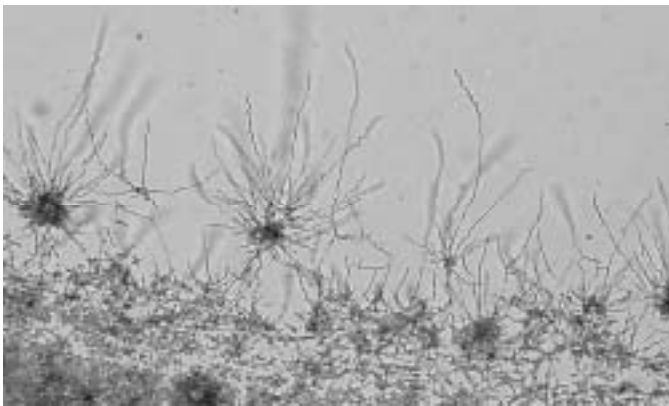
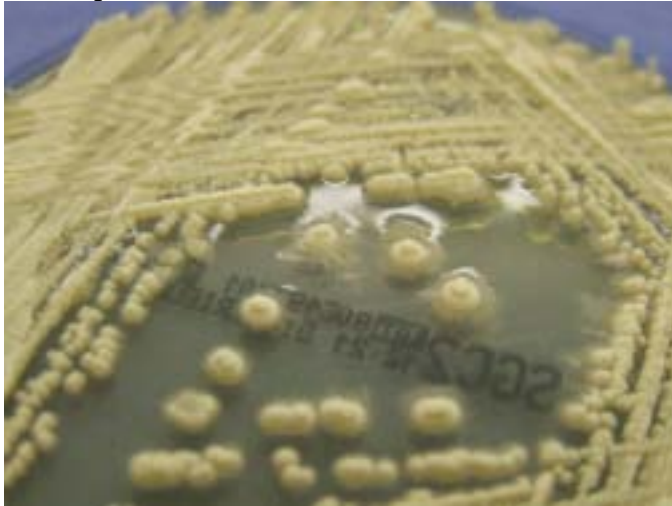
*Geotrichum capitatum* auf Sabouraud-Glukose-Agar



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

*Geotrichum capitatum* auf Reis-Agar

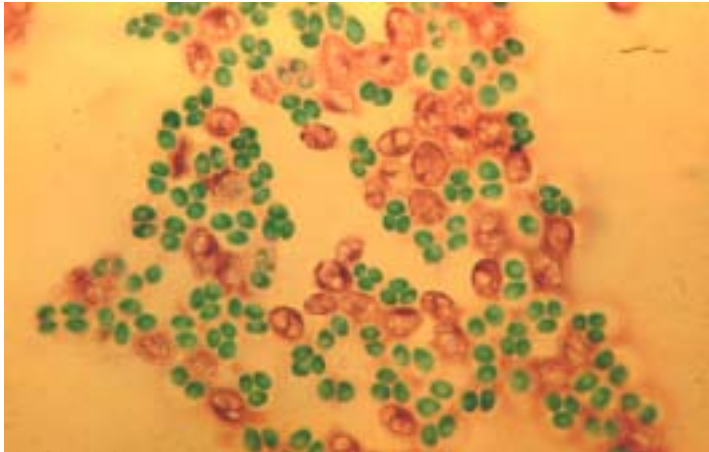
***Trichosporon asahii***



Reis-Agar: Unregelmäßig geformte sowie rechtwinklige Arthrokonidien mit abgerundeten Enden, die ca. 3-4 x 4-7  $\mu\text{m}$  messen. Appressorien (Die angeschwollene Spitze einer Hyphe oder eines Keimschlauches, die die Anheftung und das Eindringen des Pilzes in den Wirt erleichtert) sind nicht vorhanden.

***Saccharomyces cerevisiae***

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



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

*Saccharomyces cerevisiae* - Malachitgrün-Safranin-Färbung

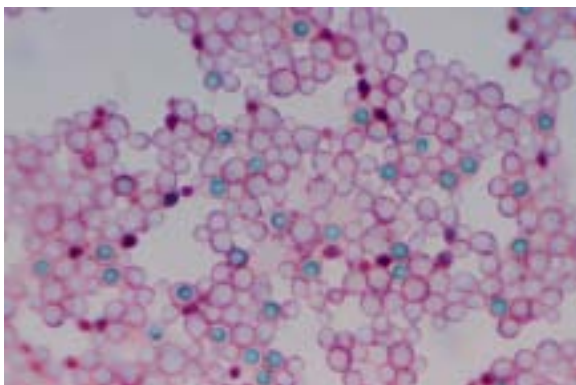
### ***Debaryomyces***

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



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

*Debaryomyces dekkeri* auf Sabouraud-Glucose-Agar



Mikroskopie auf Reis-Agar

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

*Debaryomyces nicotianae* bildet Ascosporen, Malachit-Grün-Färbung

### ***Cryptococcus neoformans***

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



Die Kolonien von *Cryptococcus neoformans* sind beige bis ockerfarbig, glänzend, schleimig. Sie haben einen Braunfärbefeffekt auf Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar nach STAIB (Negersaat-Agar).

Auf Saboraudagar bei 36 und 28°C weiße, konkave, stark glänzende Kolonien; auf Chromagar Candida BD weißer, glänzender Zellrasen, ab 48 h zunehmend violett; auf Reisagar bei 28°C nach 24 h kreisrunde Zellen mit sichtbarem Abstand zueinander (das bedeutet Schleimkapsel wie bei *Cryptococcus neoformans*!), kein Pseudomyzel; verzögertes Wachstum auf Dermatophytenagar BD (0,5 g Cycloheximid/l), bei 36°C als glatter, farbloser, glänzender Zellrasen; auf Guizotia- abyssinica-Kreatinin-Agar nach 24 h bei 36°C kein Wachstum, nach 48 h sehr kleine Kolonien, bei 28°C 1 mm große, glänzende, agarfarbene Kolonien, die nach 48 h deutlich größer und z. T. bereits **braun** gefärbt sind (Hinweis auf *Cryptococcus neoformans*)



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



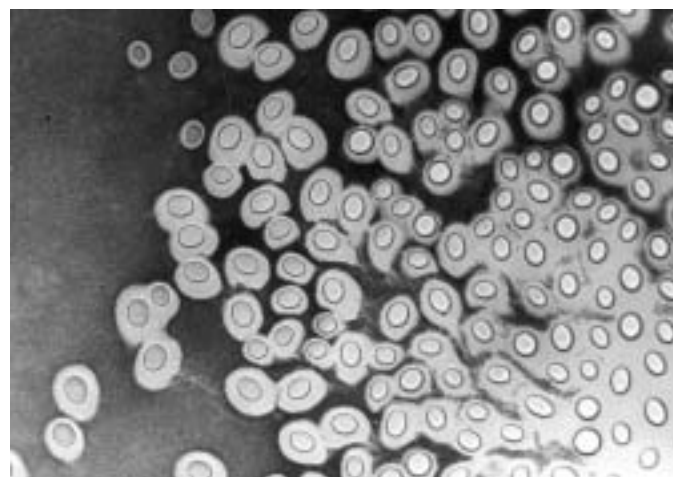
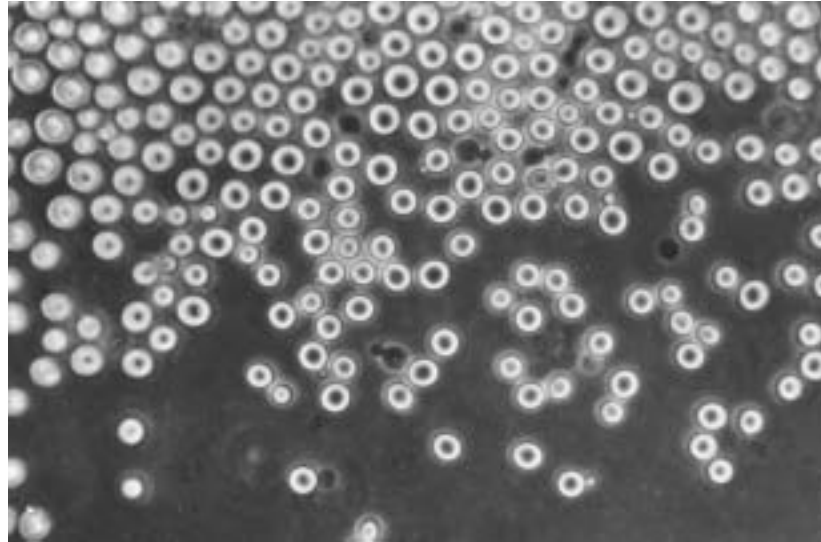
*Cryptococcus neoformans* Unterschied zwischen *Candida*-Arten (weiß) und *Cryptococcus neoformans* (braun) auf Staib-Agar

Mikroskopie auf Reis-Agar

Die Sproßzellen-Abstände sind (wegen der nicht sichtbaren Schleimkapseln) auffällig groß. *Cryptococcus neoformans* bildet kein Pseudomyzel aus. Eine spezielle Darstellung von *Cryptococcus*

*neoformans* ist im BURRI-Präparat (Tusche) möglich. Die Schleimkapsel zeichnet sich als Hof um die kleinen Sproßzellen deutlich ab. Letzteres Präparat wird zur Liquordiagnostik bei Verdacht auf zentralnervöse Kryptokokkose eingesetzt.

Reis-Agar: Sproßzellen-Abstände sind (wegen Schleimkapsel) auffällig groß, kein Pseudomyzel



*Cryptococcus neoformans* im Tusche-Präparat nach BURRI

### ***Rhodotorula***



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

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

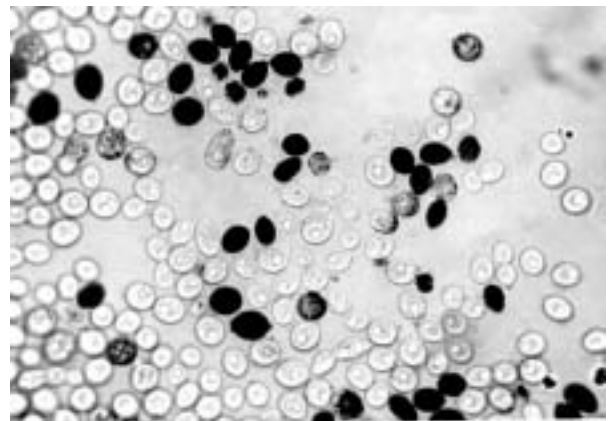
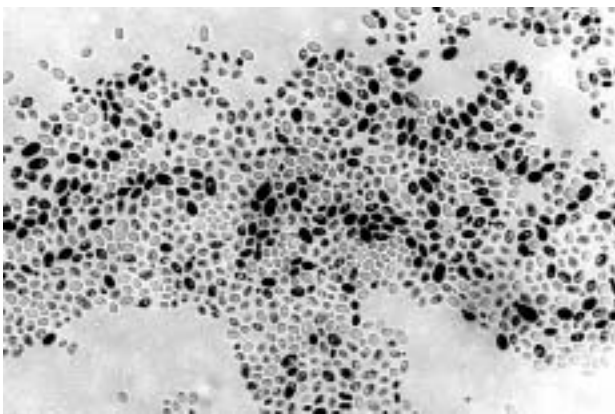
Artebene ist nicht notwendig. Erwähnt werden soll nur, dass u. a. neben *Rhodotorula rubra* oder *glutinis* auch *Rhodotorula mucilaginosa* (auffällig schleimige Kolonien) unterschieden wird.



*Rhodotorula mucilaginosa* Urinkultur

#### Mikroskopie auf Reis-Agar

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



*Rhodotorula mucilaginosa* auf Reis-Agar

#### *Geotrichum candidum*

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



*Geotrichum candidum*  
auf Sabouraud-  
Glukose-Agar

Sein Nachweis erfolgt oft im Stuhl, wo er dann die fakultativ-pathogenen Hefepilze überwuchert. Deshalb wird Stuhl am besten bei 37°C bebrütet. Bei dieser Temperatur wachsen die meisten *Geotrichum*-Stämme kaum oder überhaupt nicht, wohingegen alle sonstigen Sproßpilze gut gedeihen (bestes Wachstum von *Geotrichum* bei

Raumtemperatur). Gelegentlich kann *Geotrichum candidum* im Vaginalsekret nachgewiesen werden z. B. nach Vaginalspülungen, wenn durch Natur- bzw. Milchprodukte das saure Scheidenmilieu wiederhergestellt werden soll.

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

Mikroskopie auf Reis-Agar

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



*Geotrichum candidum* auf Reis-Agar

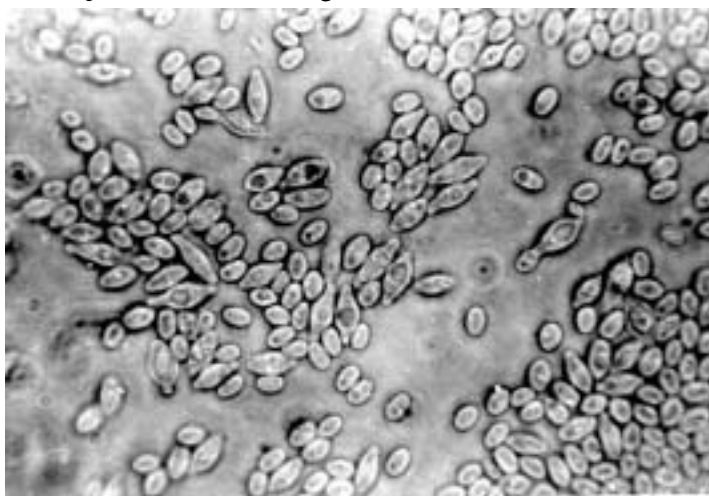
### ***Kloeckera apiculata***

Der Hefepilz ist in der Regel nur als Kontamination anzusehen. Gelegentlich wird er aus Vogelkot isoliert.

Mikroskopie auf Reis-Agar

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

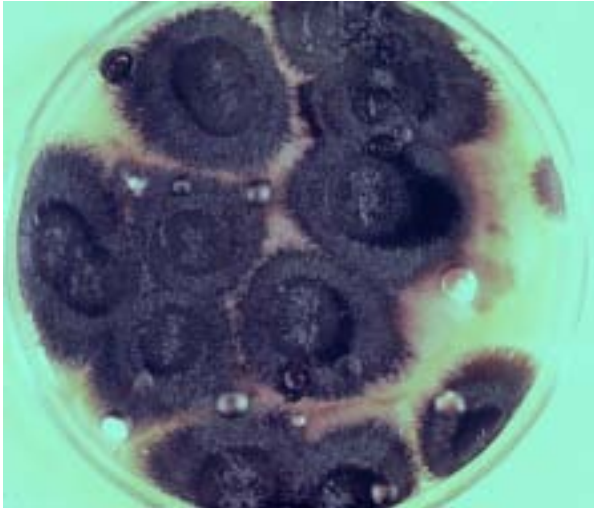
*Kloeckera apiculata* auf Reis-Agar



### *Aureobasidium pullulans*

Der flach und schnell wachsende Hefepilz ist beige, cremefarben (manchmal rosa tingiert) und kann jedoch auch braun-schwarzes Pigment auf der Oberseite ausbilden.

Es handelt sich immer um saprophytäres Wachstum, z. B. auf feuchtem Holz, selten Isolierung von der Haut, Nägeln, dann immer als Kontamination anzusehen.



*Aureobasidium pullulans*

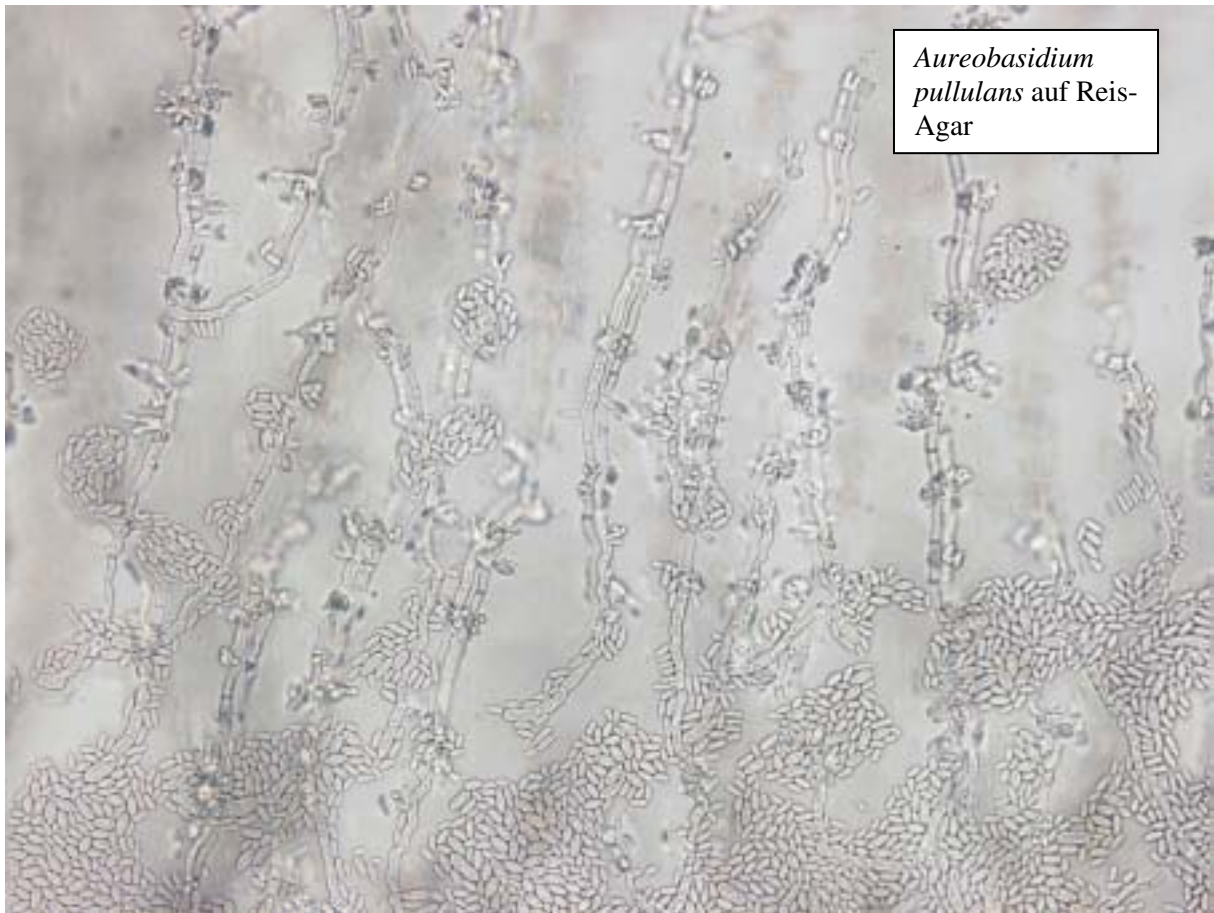
Mikroskopie auf Reis-Agar

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



*Aureobasidium pullulans* auf Reis-Agar

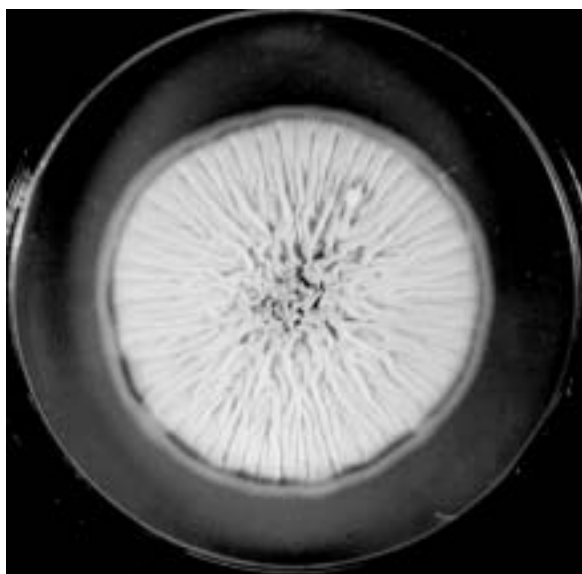




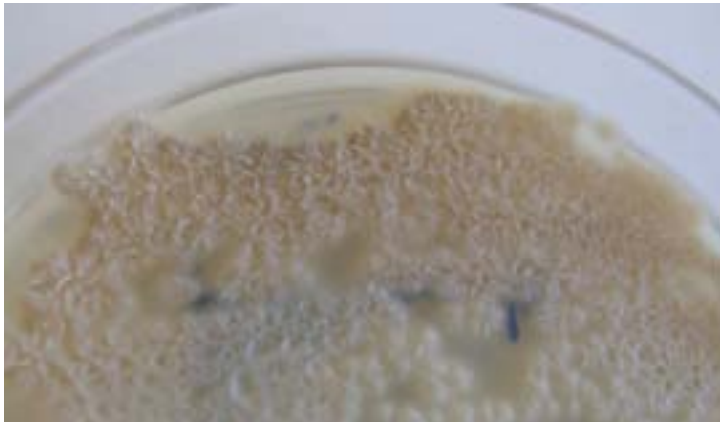
*Aureobasidium pullulans* auf Reis-Agar

***Sporothrix schenckii***

*Sporothrix schenckii* ist ein dimorpher Pilz bzw. ein Erreger von Mykosen in warmen Ländern. Es handelt sich dabei um Verletzungsmykosen (sporotrichoid, d. h. lymphogen forgeleitet) vor allem an den unteren Extremitäten (z. B. beim Barfußlaufen). Histologisch imponiert eine granulomatöse Entzündung mit zigarrenförmigen Sprosszellen und asteroid bodies



Zähe, weiß-gelbliche, evtl. später schwärzliche Kolonien von *Sporothrix schenckii* mit wenig Luftmyzel, aber mehr submers wachsendem Myzel.

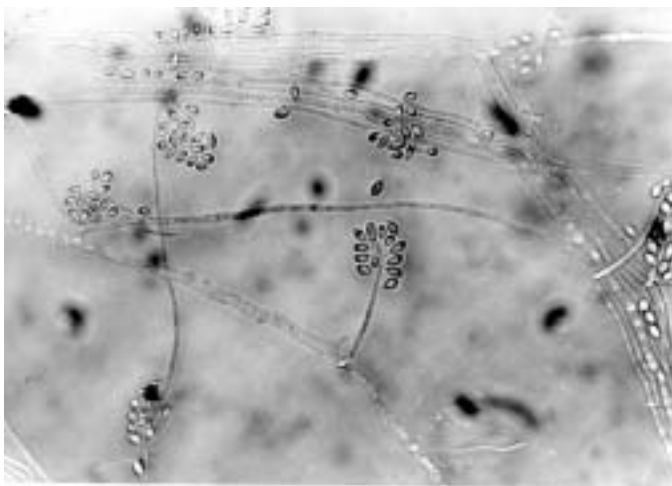


*Sporothrix schenckii* auf Sabouraud-Glukose-Agar



#### Mikroskopie

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



*Sporothrix schenckii*  
Margeritenblüten-artige Anordnung  
der Sporen



#### Entsorgung von infektiösen Labormaterialien

Nach Arbeitsabschluss sind alle mit Krankheitserregern kontaminierten Materialien sicher zu entsorgen. Möglich ist zwar auch die chemische Entsorgung, indem das kontaminierte Material in Desinfektionslösungen (entsprechend DGHM [Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie]-Liste) dekontaminiert wird, aber zuverlässiger und umweltfreundlicher ist die Sterilisation in gespanntem Wasserdampf im Autoklav. Kostenintensiv dagegen ist die heute in großen Laboren geübte Entsorgung der infektiösen Materialien (Nährmedien, etc.) im Krankenhausmüll, der nachfolgend verbrannt werden muss.

#### Abrechnungskennziffern nach EBM

Leistung	EBM-Nr.
Methylenblau-Präparat	32045, ggf. 32182 (laut Empfehlung vom Berufsverband der Deutschen Dermatologen)
ungefärbtes Deckglaspräparat	32045
Primärpräparat nach Gram	32050
Schleimhaut- und Vaginalabstriche auf Pilze	32151
Biochemische Sproßpilzdifferenzierung	32689

#### Anschrift:

Dr. rer. nat. Jürgen Herrmann  
 Laboratorium für medizinische Mikrobiologie  
 Partnerschaft Dr. rer. nat. Jürgen Herrmann & Prof. Dr. med. Pietro Nenoff  
 Straße des Friedens 8  
 D-04579 Mölbis  
 Tel.: 034347-50 323; Fax: 034347-50 123  
 e-mail: [info@mykologie-experten.de](mailto:info@mykologie-experten.de) und

PD Dr. med. Dagmar Rimek  
 Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz  
 Dezernat Medizinische Mikrobiologie  
 Nordhäuser Str. 74  
 99089 Erfurt  
 Tel.: 0361-7409125; Fax: 0361-7409111; email: [dagmar.rimek@tllv.thueringen.de](mailto:dagmar.rimek@tllv.thueringen.de)