DIAGNOSTIK UND THERAPIE DER PILZKRANKHEITEN UND NEUERE ERKENNTNISSE IN DER BIOCHEMIE DER PATHOGENEN PILZE

VORTRÄGE DER
6. WISSENSCHAFTLICHEN TAGUNG DER
DEUTSCHSPRACHIGEN MYKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT
IN WIEN
VOM 15. BIS 17. JULI 1966

HERAUSGEGEBEN VON

PROF. DR. HANS GÖTZ
KLINIKUM ESSEN DER RUHRUNIVERSITÄT BOCHUM
UND
DR. HANS RIETH
HAMBURG

UNTER MITARBEIT VON

DR. OTTO MALE
I. UNIVERSITÄTS-HAUTKLINIK IN WIEN
UND
UNIV.-DOZ. DR. JOSEFINE THURNER
II. UNIVERSITÄTS-HAUTKLINIK IN WIEN

MIT 178 TEXTABBILDUNGEN

1970
GROSSE VERLAG
BERLIN

Farbwerke Hoechst A.G., vorm. Meister Lucius & Brüning,
Frankfurt/Main-Hoechst

Zur Technik des mikrobiologischen Antimykotikum-Nachweises

Walter Dittmar, Frankfurt/M.-Hoechst

Mit 5 Abbildungen

Summary

When carrying out microbiological tests of antifungal compounds in diluted body fluids containing protein, false conclusions may be arrived at in regard to the quantity of the compound that is not protein-bound.

Therefore, methods should be available to carry out bio-assays on very small samples.

The author proposed a micromethod to demonstrate different levels of Griseofulvin in the blood. In particular, he pipetted the blood sample to be investigated onto a piece of filter paper and covered it with a dialyzing membrane. On the upper side of the membrane he performed a mycelial test using Trichophyton mentagrophytes as a test organism.

Mikrobiologische Nachweisversuche sind relativ unproblematisch, wenn beliebig große und einheitliche Mengen an Versuchsmaterial zur Verfügung stehen und wenn bekannt ist, welcher Art die nachzuweisende Verbindung ist. Wenn wir dagegen wirksame Präparate, die an Mensch oder Tier verabreicht wurden, in einem eiweißhaltigen Untersuchungsmaterial nachweisen wollen, so stehen wir vor erheblichen Schwierigkeiten. In der Regel ist dabei nicht bekannt, ob noch die ursprüngliche Verbindung oder ein aktives Metabolisierungsprodukt derselben vorliegt. Wenn die Versuchsmaterialien auch noch primär unterschiedlich beschaffen sind und nur in kleinen Mengen vorliegen, die nicht ohne weiteres verdünnt werden dürfen, so können wir solche Nachweise ohne besondere Methoden kaum durchführen. Darum sollten entschiedene Anstrengungen gemacht werden, um Routineverfahren zur Untersuchung von Mikromengen an Untersuchungsmaterial zu entwickeln. Die Verfahren sollten von zeitbeanspruchenden Diffusionsvorgängen frei sein, rasch ablaufen und durch die Erfassung von teilhemmenden Präparatkonzentrationen eine hohe Nachweisempfindlichkeit besitzen. Zugleich sollten ihre einfache Durchführung und

eine makroskopische Meßwertermittlung die serienweise Anwendung ermöglichen. Endlich müßte eine ausreichende Nachweisgenauigkeit bzw. Genauigkeit der Aktivitätsbestimmung erzielt werden.

Wir haben die Voraussetzungen für die Aufstellung eines solchen Verfahrens untersucht und sind — für die Verwendung von myzelbildenden Testkeimen — zu den nachfolgenden Bedingungen (a,b), Fragestellungen (c, d) und Durchführungsprinzipien (e) gelangt:

a) Die Testkeime müssen völlig von Versuchsmaterial benetzt sein und der Nachstrom von Hemmstoff aus dem Versuchsmaterial an den wachsenden Testkeim muß möglichst rasch erfolgen.

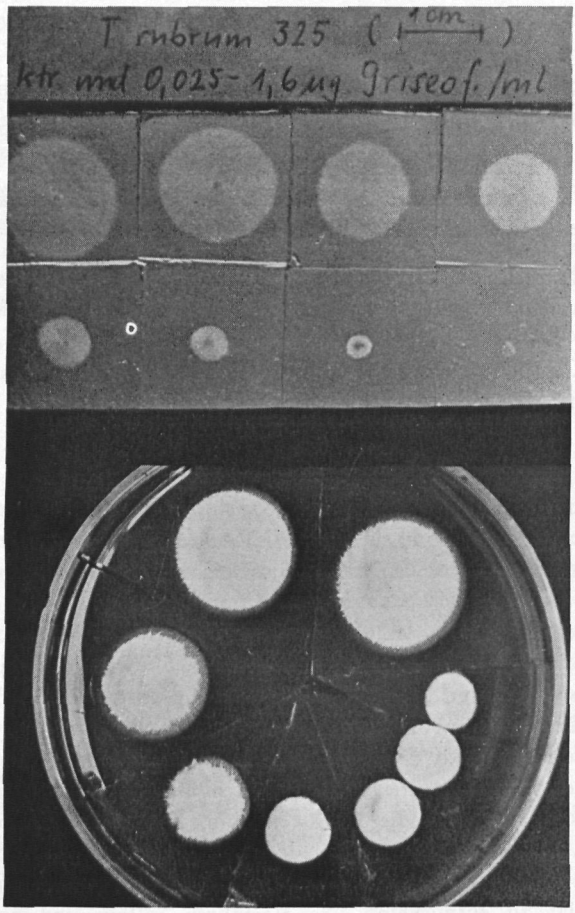


Abb. 1: Koloniewachstum von Trichophyton rubrum (325) auf Agarmedium mit Griseofulvinzusatz (0; 0,025 — 1,6 µg ml).
Wachstumshemmung bei freiem Oberflächenwachstum (unten) und bei Bedeckung mit Deckglas (oben)

b) Es muß ein flächenhaftes, möglichst sogar einschichtiges Myzelwachstum erzielt werden, das ohne Mikroskopbenutzung meßbar ist. Eine räumliche, dichte und voluminöse Myzelentwicklung würde zur frühzeitigen Erschöpfung der Hemmstoff- und Nährstoffmenge führen.

In einem einfachen Modellversuch auf Agarmedium mit abgestuften Griseofulvin-Konzentrationen und mit Trichophyton rubrum als Testkeim läßt sich demonstrieren, was hiermit gemeint ist und wie das Gewünschte zu erreichen ist (**Abb. 1**). Man sieht, wie das Wachstum der Testkeime an völlig freier Nährbodenoberfläche zu einer voluminösen Kolonieentwicklung mit Luftmyzelbildung führt. Dagegen kann man durch eine einfache Bedeckung des Inokulums mit einem Deckglas sowohl eine völlige Benetzung wie ein zartes, hauchdünnes Koloniewachstum erzielen. Stellt man aus den Wachstumswerten die Dosis-Wirkungs-Kurven im Wahrscheinlichkeitsnetz mit logarithmischen Hemmstoffkonzentrationen auf (**Abb. 2**), so ergibt sich ferner, daß nur nach Kultur mit Deckglas-

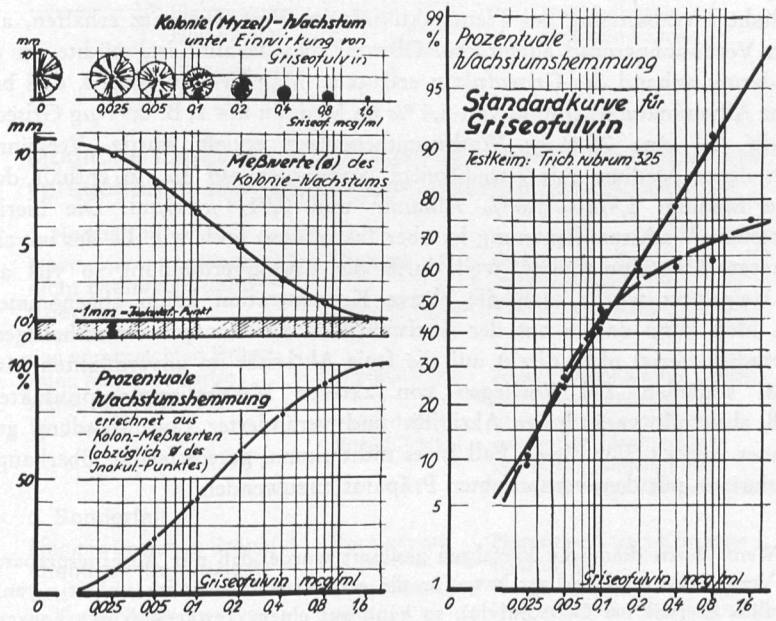


Abb. 2: Verlauf der Aufstellung einer Standardkurve (Dosis-Wirkungskurve) für Griseofulvin zum Zweck der mikrobiologischen Griseofulvin-Bestimmung sowie zur Ermittlung der Hemmwirksamkeit von Griseofulvin gegenüber Pilzen.

Versuchsmethodik: Mycelwachstumstest auf Agarmedium mit Deckglas-Bedeckung. (Zum Vergleich: DW-Kurve bei Versuchsdurchführung ohne Deckglas, dargestellt im Bild rechts durch ·—·)

Bedeckung eine gerade Regressionslinie zu erzielen ist. Bei Wachstum an freier Oberfläche kommt es dagegen zur Entstellung der DW-Beziehungen.

c) Bei der Durchführung der Untersuchung von Körperflüssigkeiten tritt die wesentliche Frage auf, ob das Versuchsmaterial verdünnt werden darf oder nicht. Das therapeutische Interesse hat nun in erster Linie dem freien, ungebundenen Hemmstoffanteil im unverdünnten Versuchsmaterial zu gelten. Nach der heute meistvertretenen Auffassung ist der freie Präparatanteil im Blut die Ausgangskonzentration für die Verteilung eines Präparates in die Gewebe. Im Gewebe ist wiederum der freie Anteil als der eigentlich wirksame anzusehen. In zweiter Linie interessiert aber auch der an Eiweiß (vermutlich reversibel) gebundene Präparatanteil, weil er als Nachschubdepot für die freie Menge dienen dürfte (**Abb. 3**). Wenn wir nun für den Test das Untersuchungsmaterial mit eiweißfreien Medien verdünnen, so vermindern wir auch die Eiweißkonzentration und damit die Bindung der Substanz an das Eiweiß. Diese Freisetzung von Präparat bewirkt, daß wir bei Versuchen an verdünntem Material keine so hohe Herabsetzung der Hemmaktivität im Versuchsansatz erhalten, als dem Verdünnungsgrad entspräche. Obwohl dies bekannt ist, möchte ich es wiederum anhand des Griseofulvin erläutern. Man sieht in **Abb. 4**, daß bei einer Albuminkonzentration von 6,4 % im Medium mit z. B. 0,91 μg Griseofulvin /ml eine 75 %ige Wachstumshemmung erzielt wurde. Verdünnt man dieses Medium mit eiweißfreiem Nährboden auf $^1/_4$, so enthält das neue Medium 6,4/4 = 1,6 % Albumin und 0,91/4 μg G/ml. Die hierin gemessene Wachstumshemmung ist aber fast ebenso hoch wie die des unverdünnten Albuminmediums, weil durch die Eiweißverdünnung so viel an G. freigesetzt wurde, daß die aktive Konzentration kaum abgenommen hat. Man kann darum aus der Aktivität von verdünntem, eiweißhaltigem Versuchsmaterial nicht direkt auf die freie Aktivität im unverdünnten Material schließen. Bei Vorliegen von aktiven Metabolisierungsprodukten muß aber mit veränderter Aktivität und veränderter Eiweißbindung gerechnet werden. Für diesen Fall ist es nicht einmal gerechtfertigt, überhaupt Eichkurven mit dem verabreichten Präparat anzuwenden.

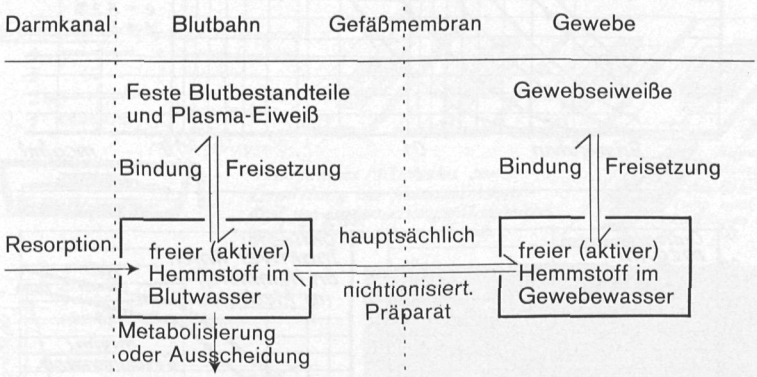
Wenn durch chemische Verfahren gesichert wurde, daß nur Ausgangspräparat im Versuchsmaterial vorliegt bzw. für die gemessene Hemmwirksamkeit verantwortlich ist (wie bei Griseofulvin), so kann aus einem Testversuch mit konzentriertem oder verdünntem Material auf die freie und gesamte Präparatmenge geschlossen werden. Hierzu sind Eichserien mit unverdünntem und verdünntem Leer-Versuchsmaterial und ohne solches nötig.

d) Weil wir also in der Regel nicht wissen, auf welche Art von Präparat eine gefundene Aktivität zurückzuführen ist, so verbleibt bei konsequentem Vorgehen nur die Möglichkeit, die graduelle Hemmfähigkeit des un-

verdünnten Materials als Nachweisergebnis anzugeben. Diese Aktivität ist keinesfalls als einfach proportional zu der zugrundeliegenden Präparatkonzentration anzusehen. Als Hauptaufgabe ergibt sich hieraus, die auf die

Therapeutisch wichtige Hemmstoffkonzentrationen im Körper

Nach derzeitiger Auffassung wesentliche Wege der Präparatverteilung:



Mögliche Ergebnisse aus mikrobiologischen Nachweisversuchen in eiweißhaltigem Untersuchungsmaterial:

1. Normalfall

Hemmwirksames Präparat **nicht chemisch identifiziert** (Metabolisierungsprod. des verabreichten Präparates mit veränderter Aktivität und Eiweißbindung?)

Versuch mit unverdünntem Versuchsmat. → **Hemmwert** des **freien** Präparatanteils im Versuchsmaterial

(Versuch mit verdünntem Versuchsmat. → wegen unbekannter Größe der Eiweißbindung nur grober Rückschluß auf möglichen Maximalwert der freien Aktivität im unverdünnten Versuchsmat.)

2. Sonderfall

Hemmwirksames Präparat **chemisch identifiziert** und in Versuchsmengen vorliegend (z.B. Griseofulvin)

Versuch mit unverdünntem oder verdünntem Versuchsmat. → **Hemmwert** und **Konzentration** des **freien** und **gebundenen** Präparates im Versuchsmat.

(benötigt: *Eichkurven mit unverdünntem, verdünntem und fehlendem Leer-Versuchsmaterial*)

Abb. 3: Darstellung der bei mikrobiologischen Nachweisversuchen in eiweißhaltigem Untersuchungsmaterial gegebenen Möglichkeiten

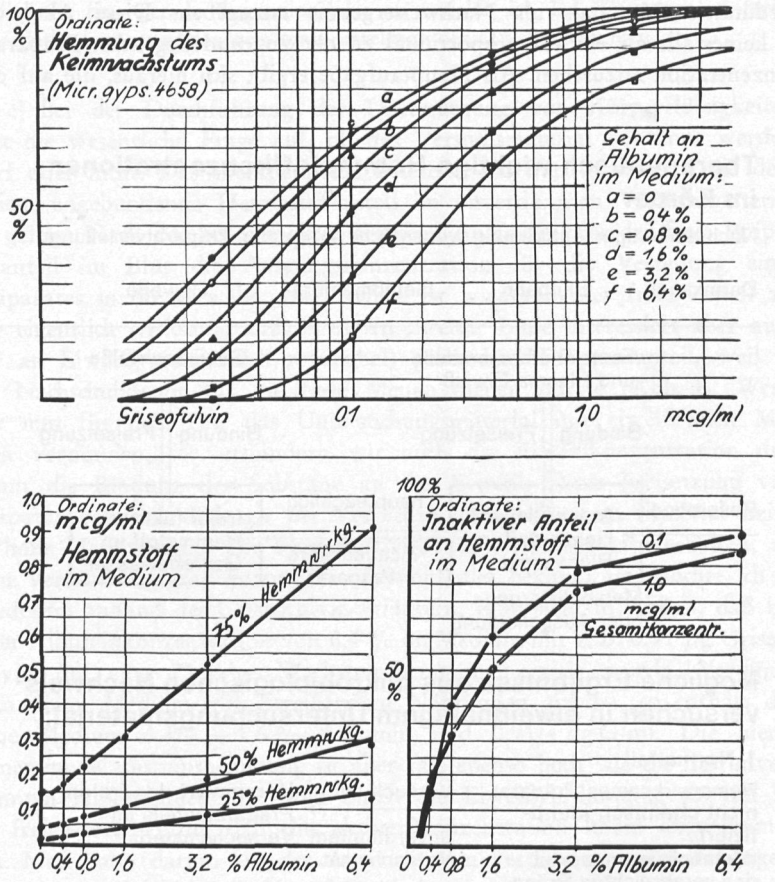


Abb. 4: Hemmwirksamkeit von Griseofulvin gegenüber Microsporum gypseum (4658) in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an Rinderalbumin.

Versuchsmethodik: Mycelwachstum auf Agarmedium

Präparatverabreichung zurückzuführende Aktivität von der primären, individuumeigenen Aktivität abzugrenzen.

Wenn wir nun unverdünntes Serum, Blut oder Gewebsmaterial direkt mit dem Testkeim beimpfen würden, um einen Myzelwachstums- oder -Hemmungstest anzustellen, so käme es zu einem sehr gestörten Keimwachstum. Der individuumeigenen Fungistase wäre freier Lauf gelassen. Man kann diese Wirkungen aber hochgradig abschwächen, indem man zwischen die Versuchsprobe und das Inokulum eine dünne Dialysemembran setzt*.

*) Dialysemembran Typ C für Autoanalyzer (Fa. Technicon)

Ob die Membran von dem nachzuweisenden Präparat (bzw. Molekülen ähnlicher Größe) passiert werden kann, läßt sich in einem Orientierungsversuch leicht feststellen.

e) Wenn wir die Folgerungen aus dem Gesagten ziehen, so ergibt sich für einen Myzelwachstumstest mit Mikromengen an Versuchsmaterial die folgende Versuchsanordnung (**Abb. 5**):

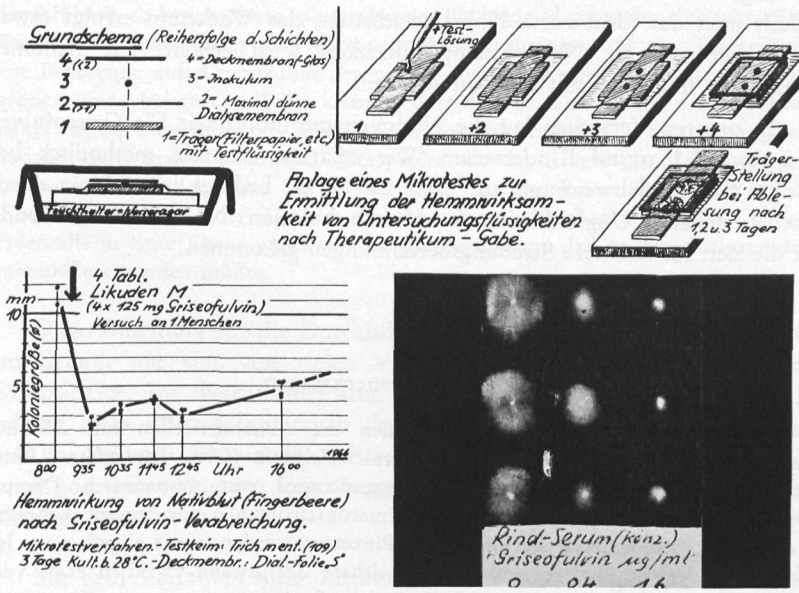


Abb. 5: Versuchsanordnung für einen Mycelwachstumstest mit Mikromengen an Versuchsmaterial

Es werden auf einem Objektträger vier Filterpapierstückchen, wie im Bild zu sehen, angeordnet und mit Versuchsmaterial (ca. 0,05—0,15 ml) bis zum Triefen getränkt. Auf diese legt man eine dünne Dialysemembran, ohne daß hierbei Versuchsmaterial auf die Oberseite der Membran gelangt. Zwei Punkte der Membranoberseite werden dann punktförmig beimpft und mit einer zweiten Membran bedeckt, die etwas stärker als die erste, aber allseitig kleiner ist. Durch die Kapillarkraft zwischen den beiden Membranen treten Wasser und niedermolekulare Stoffe (praktisch immer Präparat und Nährstoffe) in den beimpften Zwischenraum ein, d. h. es erfolgt eine Membran-Ultrafiltration. Nach etwa drei Tagen Kultur in feuchter Kammer sind in dem Spaltraum bei Testen mit Dermatophyten zarte Kolonien von maximal 10 mm Durchmesser entstanden. Man sollte nach 1 Tag und nach Erreichen gut meßbarer Koloniegrößen (ca. 8 mm bei Kon-

trollen) Messungen vornehmen, indem man die mittleren Filterpapierteile des Trägers (1) nach außen zieht, wie in der **Abb. 5** rechts zu sehen ist. Zur Messung eignen sich sterilisierte Ausschnitte aus Millimeterpapier oder ein Stechzirkel, mit denen man auf die Mikrokultur geht. Eleganter ist die Benutzung eines parallaxefreien Lineals, das man selbst herstellen kann und das Koloniemessungen durch den Boden der feuchten Kammer (Petrischale) hindurch erlaubt.

Legt man anstatt einer zweiten Dialysemembran ein Deckglas auf, so erhält man das ideal zarte Koloniewachstum, das Wachstum erfolgt etwas langsamer und die Nachweisempfindlichkeit wird erhöht. Die Koloniemessungen sind dann mit Lupe anzustellen.

In unseren Versuchen lag die Nachweisempfindlichkeit für Griseofulvin bei etwa 0,1 μg/ml Rinderserum. Wir schätzen die rein methodisch bedingte Standardabweichung auf etwa 5—10 %, bedingt in 1. Linie durch noch bestehende Ungleichheiten bei der Inokulation. Nach deren Behebung ist die Zeit für exaktere Streuungsberechnungen gekommen.

Technische Bemerkungen

1. Sterilität: Zur Blutabnahme werden die Abnahmestellen mit Alkohol desinfiziert und die Versuchshilfsmittel mit Heißluft (Glas, Papierfilter, Blutabnahmeinstrumente) sterilisiert. Wasseragar wird mit gespanntem Dampf, Dialysemembranen und heparinisierte Hämatokritröhrchen zur Serumgewinnung werden mit Äthylenoxyd sterilisiert, die Pinzetten werden vorne abgeflammt. Im übrigen bildet die Dialysemembran eine sichere Trennwand zwischen etwa verunreinigtem Versuchsmaterial und inokuliertem Spaltraum.

2. Auflegen der Membranen: Zur Versuchsdurchführung ist naturgemäß eine ausreichende Geübtheit in mikrobiologischer Sterilarbeit nötig. Sicher wird es aber nicht beim ersten Mal gelingen, die — zunächst noch trockene — erste Dialysemembran glatt auf das feuchte Trägersystem zu legen, weil sich die Membran bei der einseitigen Benetzung in Falten legt. Man faßt daher die Membran mit einer stumpfen Pinzette an einer Seite an, zu der die Membranstruktur parallel läuft. Beim Auflegen verhindert man mittels einer zweiten Pinzette, daß sich die gegenüberliegende Membranseite hoch- und umschlägt und streicht dann die drei nicht angefaßten Ränder auf dem Objektträger fest. Dabei darf keine Flüssigkeit auf die Oberseite der Membran übertragen werden. Den zuerst angefaßten Membranrand legt man noch nicht an, sondern läßt ihn durch Hochhalten noch 2 bis 3 mm breit trocken. Dann hebt man die übrige, schon feuchte Membran wieder in ca. drei Viertel ihrer Breite von der Unterlage ab, läßt sie wieder zurückgleiten und kann sie nach einer evtl. Wiederholung dieser Aktion ohne ausgesprochene Falten endgültig auflegen. Nun wird auch der vierte Rand ganz aufgelegt. Ein störender Überschuß an Versuchsflüssigkeit läßt sich mittels sterilen Filterpapiers absaugen. Nach einigem Üben kann man die ganze Prozedur in wenigen Sekunden erledi-

gen. Die Technik ist keinesfalls schwieriger als diejenigen, die üblicherweise vom klinischen Laborpersonal verlangt werden.

Zum Auflegen der zweiten, dickeren Membran drückt man diese zunächst auf die Impfstellen und streicht sie zwischen diesen mit gerundetem Pinzettenrücken fest an, bis unter sie (sogleich sichtbar) Flüssigkeit austritt. Dann streicht man sie randwärts fest und drückt dabei größere Luftbläschen heraus.

Kann man den Versuch mit mehr als nur einigen Tropfen Versuchsmaterial durchführen, so benutzt man günstigerweise für beide Membranen eine sehr dünne Dialysefolie. Diese kann man dann vor dem Aufbringen auf das Trägersystem zur Benetzung auf Agarmedium legen und dort glattziehen bzw. -streichen. Die größere wird beimpft und die kleinere daraufgelegt. Dann wird das Membranpaket auf das inzwischen mit dem Versuchsmaterial beschickte Trägersystem gelegt. Sodann zieht man die inneren Filterpapierteile des Trägers langsam und ganz heraus und füllt fehlendes Versuchsmedium von der Seite nach. Man kann bei dieser Methode zu jeder Zeit das Koloniewachstum beobachten, hat die Myzelfäden alle in einer Ebene und kann fotografieren, ohne daß an dem Kultursystem manipuliert werden müßte.

Diese Anleitung für die Durchführung der Nachweismethodik vermittelt im Grunde nur eine von vielen Variationen zur Realisierung des Nachweisprinzips. Im wesentlichen kam es hier auf die Ermittlung und Mitteilung eines Prinzips an, durch dessen Anwendung die eingangs genannten Forderungen für ein brauchbares Routineverfahren erfüllt werden. Es wird noch einer längeren Erprobungszeit bedürfen, um die günstigste Variante herauszufinden.

Mit dem Verfahren sollte im übrigen nicht nur ein Weg zum Präparat- bzw. Wirksamkeitsnachweis in Untersuchungsmaterialien gesucht werden. Eine derartige Testmethodik eignet sich u. E. generell zur Durchführung von Myzelwachstumstesten in flüssigem Medium. Für Versuche mit unverdünnten Seren, z. B. zur Feststellung der Serumbindung von Präparaten, wobei man diese im Reagenzglas den Seren zumischt, sind solche Verfahren unentbehrlich. Wir haben auch die stille Hoffnung, daß solche Verfahren in modifizierter Form für Versuche mit Hefen und Bakterien geeignet sind.

Hiermit sollen die Ausführungen über das Thema Nachweismethodik beendet werden. Es wäre zu hoffen, daß sie nicht nur verständlich waren, sondern auch für möglichst viele Interessenten nützlich sein werden.

Dr. W. Dittmar
Labor f. Chemotherapie der Mykosen
Farbwerke Hoechst A.G.
Frankfurt/M.-Hoechst