HUMANPATHOGENE PILZE IM TIER- UND PFLANZENREICH

VORTRÄGE DER
5. WISSENSCHAFTLICHEN TAGUNG DER
DEUTSCHSPRACHIGEN MYKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT
IN MÜNCHEN
AM 17. UND 18. JULI 1965

HERAUSGEGEBEN VON

PROF. DR. HANS GÖTZ
KLINIKUM ESSEN DER RUHRUNIVERSITÄT BOCHUM

UND

DR. HANS RIETH
HAMBURG

MIT 82 TEXTABBILDUNGEN

1969
GROSSE VERLAG
BERLIN

Hygiene-Institut der Philipps-Universität Marburg/Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. SIEGERT)

Vergleichende immunelektrophoretische Untersuchungen an Hefen

H.-L. MÜLLER, Marburg

Mit 6 Abbildungen

Wie wir früher berichteten (1), konnten wir ebenso wie BIGUET (2) mit Hilfe der Immunelektrophorese außer Polysaccharid- bzw. Glykoproteidantigenen eiweißartige Substanzen mit Antigencharakter nachweisen. Die beiden Substanzgruppen trennen sich in der Agarelektrophorese auf. Die Eiweißgruppe wandert zur Anode und läßt sich mit Amidoschwarz anfärben, während die Polysaccharide bzw. Glykoproteide zur Kathode wandern und durch PAS-Färbung sichtbar werden. Immunelektrophorese-Untersuchungen mit z.B. Anti-Candida albicans-Serum gegen C. albicans- und C.tropicalis-Antigenen ergaben, daß beide Substanzgruppen antigen sind. Bei Untersuchungen mit getrenntem Zellmaterial konnten wir nachweisen, daß im Zellinhalt sowohl eiweißartige- als auch Polysaccharidantigene enthalten sind, während in der Zellwand nur Polysaccharidantigene lokalisiert sind.

Bei Absorptionsversuchen mit intakten Hefezellen und Nachweis der Restantikörper mit der Zellagglutination, wie sie von TSUCHIYA (3), JONSEN (4) u.a. zur Aufstellung von Antigenformeln durchgeführt wurden, können demnach nur die Polysaccharid- bzw. Glykoproteidantigene erfaßt werden. Um auch die Eiweißantigene zu erfassen, bevorzugen wir für unsere Antigenuntersuchungen wie BIGUET (2) die Immunelektrophorese.

Wenn auch die Eiweißantigene möglicherweise für den Antikörpernachweis bei Erkrankten keine Rolle spielen, so sind sie doch für die Feststellung von Antigengemeinschaften zwischen einzelnen Hefen oder auch umgekehrt zur Unterscheidung einiger Arten wichtig. So fanden wir bei den beiden Hefen C. albicans und C. tropicalis, die lange Zeit als antigengleich galten, bis TSUCHIYA ein zusätzliches Polysaccharidantigen bei C. albicans feststellte, zusätzliche Differenzen in den Eiweißantigenen.

Weitgehende Antigengemeinschaften sind zwischen C. albicans und C. stellatoidea bekannt. Die Abb. 1 und 2 zeigen den Vergleich von C. albicans, C. tropicalis und C. stellatoidea. Beide Bilder zeigen, daß zwar enge Antigengemeinschaften zwischen den drei Hefen bestehen, jedoch sind sie nicht völlig antigengleich. C. stellatoidea und C. tropicalis unterscheiden sich deutlich sowohl in ihren Eiweiß- als auch Polysaccharidantigenen, C. albicans und C. stellatoidea andeutungsweise in den Polysaccharidlinien.

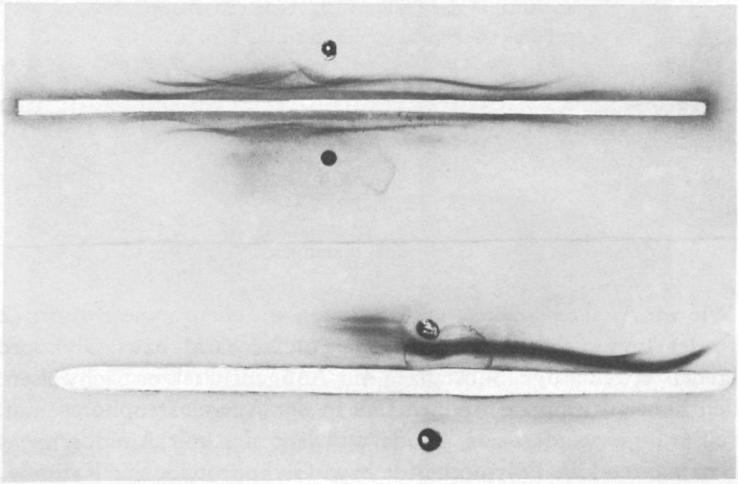

Abb. 1. Oberer Objektträger: C. albicans gegen C. stellatoidea mit Anti-C. albicans-Serum
Unterer Objektträger: C. tropicalis gegen C. stellatoidea

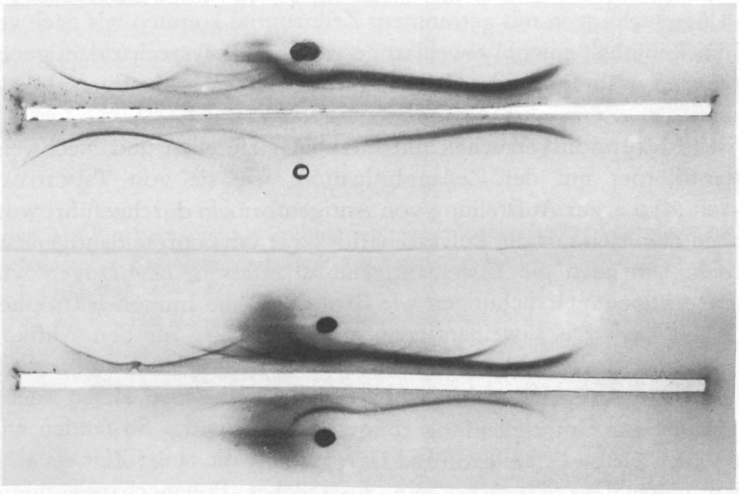

Abb. 2. Oberer Objektträger: C. stellatoidea gegen C. albicans mit Anti-C. stellatoidea-Serum
Unterer Objektträger: C. stellatoidea gegen C. tropicalis mit Anti-C. stellatoidea-Serum

Da die Polysaccharide im elektrischen Feld schlecht wandern, ist die Trennung der einzelnen Präzipitationslinien unbefriedigend. Die gleiche Erfahrung hatten wir schon früher bei dem Vergleich von C. albicans und C. tropicalis gemacht. Wir versuchten deshalb, die spezifischen Antigene nach Absorption der gemeinsamen Antikörper im Immunserum mit intakten heterologen Hefezellen zur Darstellung zu bringen. Wie nach den Befunden von TSUCHIYA zu erwarten, ließ sich nach Absorption eines Anti-C. albicans-Serums mit Tropicalis-Zellen ein spezifischer Antikörper gegen Albicans nach-

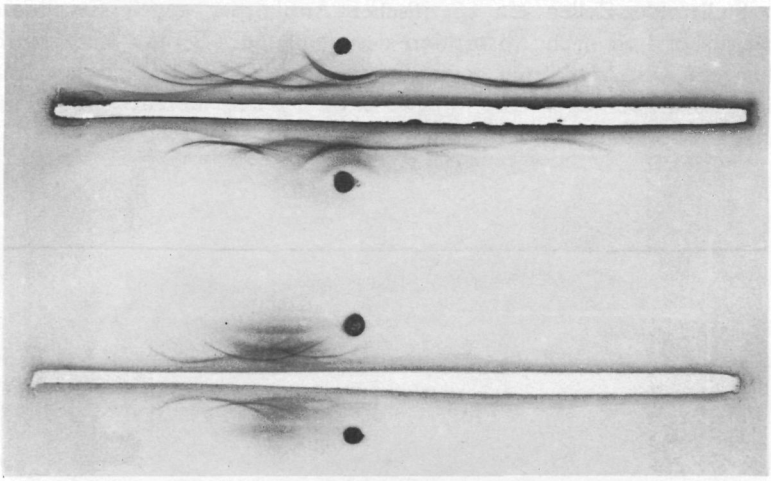

Abb. 3. Oberer Objektträger: C. albicans gegen C. stellatoidea mit Anti-C. albicans-Serum vor Absorption
Unterer Objektträger: C. albicans gegen C. stellatoidea mit Anti-C. albicans-Serum nach Absorption mit C. stellatoidea-Zellen

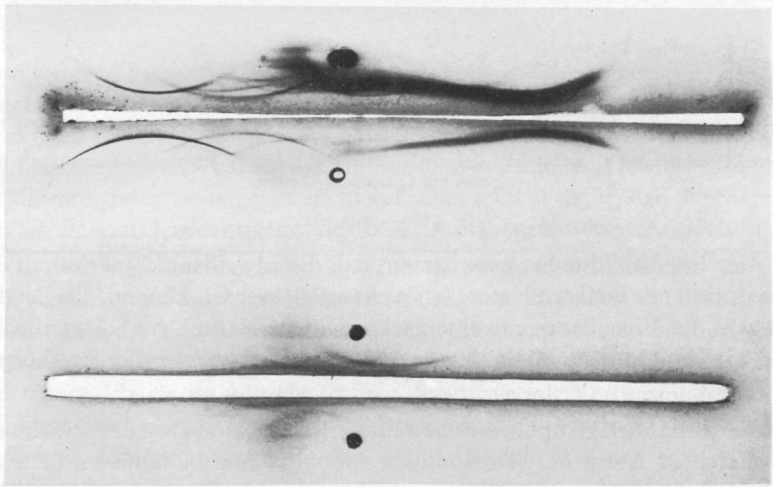

Abb. 4. Oberer Objektträger: C. stellatoidea gegen C. albicans mit Anti-C. stellatoidea-Serum vor Absorption
Unterer Objektträger: C. stellatoidea gegen C. albicans mit Anti-C. stellatoidea-Serum nach Absorption mit C. albicans-Zellen

weisen. Bei Absorption von Tropicalis-Seren mit Albicans-Zellen ließ sich kein Rest-Antikörper darstellen. Soweit stimmen unsere Befunde mit TSUCHIYA überein.

Die Abb. 3 und 4 zeigen die gleiche Versuchsanordnung mit C. albicans und C. stellatoidea. Man sieht, daß nach Absorption des Albicans-Serums

mit Stellatoidea-Zellen ein spezifischer Antikörper gegen C. albicans zurückbleibt und nach Absorption des Stellatoidea-Serums mit C. alb.-Zellen ein Rest-Antikörper gegen C. stellatoidea. Dieser spezifische Antikörper wird noch deutlicher in der 5. Abb., welche die Absorption eines Stellatoidea-Serums mit Tropicalis-Zellen zeigt.

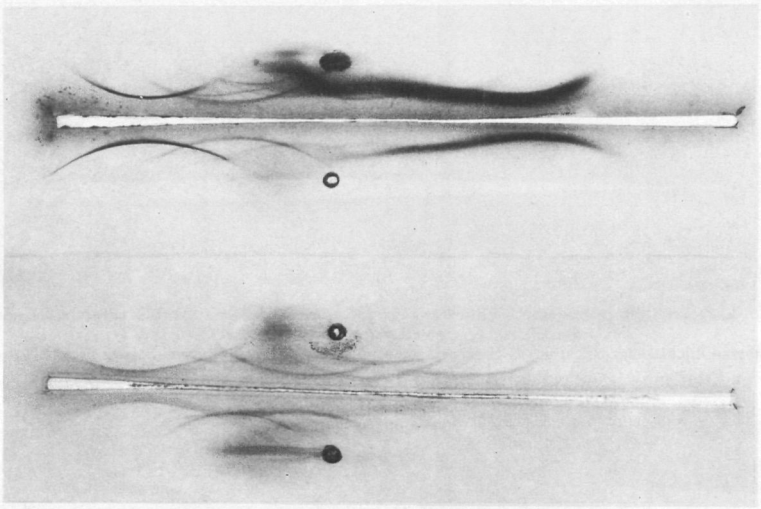

Abb. 5. Oberer Objektträger: C. stellatoidea gegen C. albicans mit Anti-C. stellatoidea-Serum vor Absorption
Unterer Objektträger: C. stellatoidea gegen C. albicans mit Anti-C. stellatoidea-Serum nach Absorption mit C. tropicalis-Zellen

Aus den Abbildungen geht hervor, daß die Eiweißantikörper durch die Absorption mit intakten Hefezellen nicht erfaßt werden können. Da bei der Vielzahl der Eiweißantigene eine exakte Differenzierung oft schwierig ist, sind wir bemüht, eine Methode zur Absorption entsprechender Antikörper zu finden.

Die Immunelektrophorese bewährte sich uns auch zum Nachweis thermolabiler Antigene. Wir konnten, wie wir schon berichteten, thermolabile Eiweißantigene bei C. alb. und C. trop. nachweisen. Aus der Abb. 6 geht hervor, daß C. stellatoidea ebenfalls thermolabile Eiweißantigene besitzt, dazu aber auch noch thermolabile Antigene auf der Kathodenseite – vermutlich Glykoproteidantigene –, die bisher unbekannt waren. Auf dem oberen Objektträger ist das nicht erhitzte Stellatoidea-Homogenisat dem auf 60 °C erhitzten gegenübergestellt. Es fehlen bei dem erhitzten Homogenisat einige Eiweiß- und 2 Polysaccharid- bzw. Glykoproteidlinien. Da möglicherweise die Trägersubstanzen der Polysaccharidantigene durch das Erhitzen geschädigt und dadurch andere Wanderungsbedingungen ein-

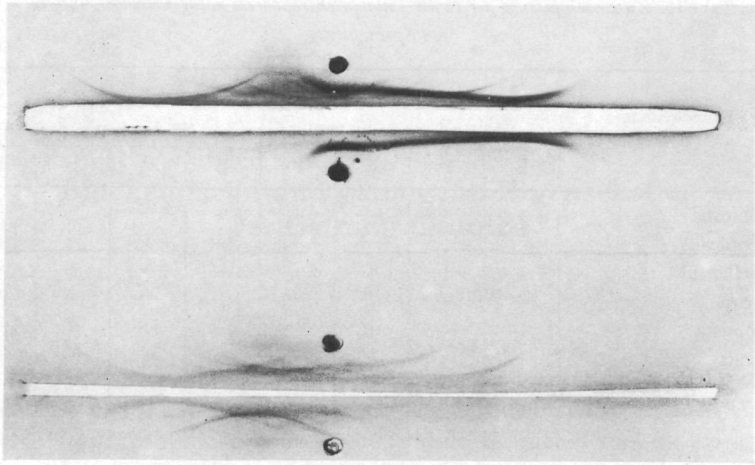

Abb. 6. Oberer Objektträger: C. stellatoidea-Homog. nicht erhitzt gegen C. stellat.-Hom. auf 60 °C erhitzt mit Anti-C. stellatoidea-Serum
Unterer Objektträger: C. stellatoidea gegen C. albicans mit Anti-C. stellatoidea-Serum nach Absorption mit auf 60 °C erhitzten C. stellat.-Zellen

getreten sein könnten, wurde – wie der untere Objektträger zeigt – als Gegenversuch das Anti-Stellat.-Serum mit erhitzten Zellen absorbiert. Mit dem nicht erhitzten Antigen stellen sich die beiden Präzipitationslinien dar, die bei dem oberen Versuch fehlen, mit dem unerhitzten Homogenisat von C. albicans treten sie dagegen nicht auf. Dies spricht dafür, daß die thermolabilen Polysaccharidantigene die für C. stella. spezifischen Antigene sind.

In weiteren Untersuchungen kreuzten wir eine willkürliche Auswahl von Candida- und anderen Hefearten mit unseren Immunseren. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt. Alle verwendeten Stämme stammen aus dem Zentralbüro für Hefekulturen in Delft. Vergleiche mit denen uns freundlicherweise von Herrn Prof. SEELIGER zur Verfügung gestellten Albicans-Stämmen A und B deuten darauf hin, daß es sich bei dem von uns benutzten Albicans-Stamm um den Typ A handelt. Aus der Tabelle gehen die schon bekannten engen Beziehungen zwischen C. albicans, C. trop. und C. stellatoidea hervor. Bei dem Vergleich mit anderen Hefen wie C. robusta und C. utilis machen sich aber auch die Spezifitätsunterschiede besonders bei Berücksichtigung der Eiweiß- und Polysaccharidantigene bemerkbar. Der Vergleich von C. robusta und Sacch. cerevisiae, die von TSUCHIYA als antigengleich angesehen wurden, zeigt, daß C. robusta ein Eiweißantigen mit C. alb. gemein hat, Sacch. cerevisiae dagegen nicht.

Die Immunelektrophorese ist zur Zeit wohl die empfindlichste Methode, Antigengemeinschaften aufzudecken, da hiermit alle Antigene erfaßt wer-

Tabelle. *Zusammenfassung der in der Immunelektrophorese nachgewiesenen Antigene von Sprosspilzen*

Homogenisat von	Antiseren gegen							
	C. alb.		C. trop.		C. stella.		T. glabr.	
	E	P	E	P	E	P	E	P
C. albicans	+++	+++	++	+++	+++	+++	–	+
C. tropicalis	++	+++	++	+++	++	+++	–	+
C. stellatoid.	+++	+++	+	+++	+++	+++	–	–
C. krusei	–	+	·/·	·/·	·/·	·/·	+	++
C. robusta	+	++	·/·	+	–	++	–	–
C. utilis	+	–	–	–	–	+	–	–
Saccharomyces cerevisiae	–	+	–	+	–	+	–	–
Torulopsis glabrata	+	+	–	–	+	–	++	+++

E = Eiweißantigene
P = Polysaccharidantigene
+++ = mehr als 3 Präzipitationslinien
++ = 2–3 Präzipitationslinien
+ = 1 Präzipitationslinie
·/· = *nicht geprüft*
– = keine Präzipitationslinie

den können. Bis es gelingt, die Antigene in reiner Form zu isolieren und dagegen gerichtete monospezifische Immunseren herzustellen, lassen sich Spezifitätsunterschiede in den Polysaccharidantigenen am besten durch Kombination der Absorption mit intakten Zellen und der Immunelektrophorese feststellen. Eine Methode zur Absorption der gegen die Eiweißantigene gerichteten Antikörper muß noch erarbeitet werden.

Literatur

1. MÜLLER, H.-L., u. H. BÜRGER: Antigenanalyse von C. albicans und C. tropicalis. 30. Tag. d. Deutsch. Ges. f. Hyg. u. Mikrob. 1965.
2. BIGUET, J., P. TRAN VAN KY et S. ANDRIEU: Mycopath. et mycol. appl. **17**, 239 (1962).
3. TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y., MIYASAKI, F. and KAWAKITA, S.: Jap. J. Exper. Med. **25**, 75 (1955).
4. JONSEN, J.: Serological studies in genus Candida. Thesis Oslo 1955.

Frau Dr. HANNE-LENE MÜLLER
Hygiene-Institut der
Philipps-Universität
355 Marburg, Pilgrimstein 2