

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

Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg  
(Direktor: Prof. Dr. H. P. R. SEELIGER)

## Negersaat-Kreatinin-Agar als Basis eines Selektiv-mediums zum Nachweis von *Cryptococcus neoformans*

F. STAIB und H. P. R. SEELIGER, Würzburg

*Cryptococcus neoformans*-Kolonien, die sich auf Sabouraud-Dextrose-Agar während einer etwa 10-tägigen Bebrütungszeit in Koloniebild und -farbe nicht auffallend von weniger gefährlichen und harmlosen Sproßpilzen unterscheiden (solange sie einige Tage alt sind), verfärben sich bei 37°C auf „Negersaat-Kreatinin-Substrat“ innerhalb von 1–4 Tagen intensiv braun (11, 12, 13).

Eine ähnliche bräunlich-gelbe Verfärbung ist nach wochenlanger Kultivierung gelegentlich, wenngleich unregelmäßig, auch auf Bierwürze- und Sabouraud-Dextrose-Agar zu beobachten.

Den sogenannten „Braunfarbefeekt“ (BFE) zeigten über 100 bisher geprüfte Sammlungsstämme aus holländischen, amerikanischen und deutschen Sammlungen, ferner 17 Stämme, frisch aus Untersuchungsmaterialien *Cryptococcose*-Kranker gezüchtet, und Stämme unmittelbar nach ihrer Isolierung aus Vogelkot und Käfigsand.

Unter den letztgenannten befand sich ein Stamm, der von L. PARTRIDGE, London, aus Taubenmist vom Gebäude eines Londoner Krankenhauses gezüchtet worden war (6).

Auf die Spezifität dieses Braunfarbefeektes für *C. neoformans* wurde inzwischen auch von anderer Seite, z.B. L. DEMOULIN-BRAHY (3), hingewiesen.

Außer bei *C. neoformans* konnte ein solcher Braunfarbefeekt bisher nur noch bei je einem Stamm von *Cryptococcus gastricus* und den mit *Cryptococcus* verwandten Arten *Candida humicola* und *Candida curvata* beobachtet werden, nicht dagegen mit *Trichosporon cutaneum*, das nach H. SEELIGER (7, 9), bzw. H. SEELIGER und R. SCHRÖTER (8) vielleicht ebenfalls in diesen Formenkreis gehört. Das Braun dieser Stämme war aber nicht so intensiv wie bei *C. neoformans*. Unter Berücksichtigung von Koloniebild, Wachstumsgeschwindigkeit und -temperatur wäre eine Verwechslung der genannten Arten mit *C. neoformans* nur schwer vorstellbar. Durch moderne serologische Methoden (T. TSUCHIYA et al. 15, L. KAUFMAN and S. BLUMER 4) ist übrigens eine sichere Abgrenzung auch serologisch möglich.

Für die Spezifität des Braunfarbefeektes für *C. neoformans* spricht auch die Tatsache, daß manche Stämme von *C. neoformans* var. *uniguttulatus* WOLFRAM und ZACH (18), die durch geringe Kapselbildung ausgezeichnet sind, einen Braunfarbefeekt geben, d.h. es handelt sich hierbei wahrscheinlich um Abkömmlinge des echten *C. neoformans*.

Die 1960 von N. J. W. KREGER-VAN RIJ (5) neu vorgeschlagene Varietät *var. uniguttulatus* (5 Stämme), die sich von *C. neoformans* durch fehlende Dulcit- und D-Arabinose-Assimilation — wie fehlendes Wachstum bei 37°C — unterscheidet, zeigt keinen Braunfarbeffekt; es handelt sich hier also nicht um *C. neoformans*, sondern wahrscheinlich um eine separate Species (14), was ebenfalls mit neuen serologischen Befunden übereinstimmt. Diejenigen *uniguttulatus*-Stämme, die einen Braunfarbeffekt zeigen, sollten somit nicht als *var. uniguttulatus*, sondern als *C. neoformans* bezeichnet werden.

Mit diesen Ergebnissen, die unabhängig und später von den Autoren gemeinsam in verschiedenen Laboratorien erzielt wurden, erscheint bewiesen, daß bei *C. neoformans* verschiedenster Provenienz eine Braunfarbreaktion durch Inhaltsstoffe der Früchte der Komposite *Guizotia abyssinica* ausgelöst wird. Weitere, gemeinsam mit A. BARTSCH (1, 2) durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, daß auch Inhaltsstoffe anderer Kompositen (z.B. Sonnenblume, Löwenzahn usw.) den gleichen Effekt bewirken.

Von besonderem Interesse ist nun die Frage, inwieweit sich dieses Substrat zum Einsatz in der Routine eignet.

1963 gelang auf Negersaat-Kreatinin-Substrat (nach 4 Tagen Bebrütung) die Isolierung von *C. neoformans* aus 8 Tage altem Sektionsmaterial (Lungenstückchen), das reichlich mit Fäulnisbakterien durchsetzt war. Hierbei handelte es sich um eine tödlich verlaufene generalisierte Cryptococose bei einer 25jährigen Frau aus München (17). Erwähnenswert ist vielleicht, daß in demselben Stadtteil, in dem die Verstorbene wohnte, *C. neoformans* aus Vogelkäfigen von Vogelhandlungen isoliert wurde (10). Auch diese Stämme zeigten auf Negersaat-Kreatinin-Substrat ebenfalls einen intensiven Braunfarbeffekt.

Der frühzeitige Nachweis von *C. neoformans* in einem Untersuchungsmaterial ist entscheidend für die lebensrettende Therapie mit Amphotericin B (J. P. UTZ und W. T. BUTLER (16)). Deshalb erscheint jeder diagnostische Hinweis, wie hier der Braunfarbeffekt bei *C. neoformans*-Kolonien, beachtenswert.

Zur Diskussion wäre zu stellen, ob die Prüfung auf Braunfarbeffekt zum *C. neoformans*-Nachweis in den täglichen Routinebetrieb eines medizinisch-mikrobiologischen Laboratoriums aufzunehmen ist, auch wenn — wie in Würzburg und Bonn — innerhalb von 1½ Jahren nur dreimal eine Cryptococose diagnostiziert werden konnte.

Das Negersaat-Kreatinin-Substrat wurde bisher allein für die Isolierung von *C. neoformans* aus Untersuchungsmaterialien des Menschen — wie Sputum, Liquor, Organabstriche — verwendet. Hierbei konnte kein störender Einfluß der Begleitflora (Bakterien und Pilze) auf den Braunfarbeffekt festgestellt werden. Bei der Verwendung dieses Substrates zur Isolierung von *C. neoformans* aus Materialien mit hohem und unbekanntem Keimgehalt kann ein entsprechender Antibiotikazusatz notwendig sein. Auf Grund bisheriger Beobachtungen haben Penicillin und Streptomycin keinen

Einfluß auf den BFE. Da Penicillin und Streptomycin jedoch zur Hemmung der Begleitflora meist nicht ausreichen, erscheint es nötig, die Antibiotikazusätze zu vermehren (z.B. durch Chloramphenicol 1 mg/ml), um eine möglichst breite antibakterielle Wirkung zu erzielen. Zur Zeit laufende Untersuchungen zur Züchtung von *C. neoformans* aus Boden- und Kotproben werden zeigen, ob sich der Antibiotika-Kreatinin-Negersaat-Agar dem umständlichen und zeitraubenden Mäuseversuch als gleichwertig oder überlegen erweist.

Leider hemmt die zur Unterdrückung von Schimmelpilzen (wie sie besonders im Vogelmist vorkommen) nötige Cycloheximidkonzentration auch das Wachstum von *C. neoformans*<sup>1)</sup>.

Die Ausschöpfung des BFE zum *C. neoformans*-Nachweis wird erst möglich sein, wenn der Mechanismus des BFE bei *C. neoformans* geklärt ist. Entsprechende Untersuchungen zu dieser Frage sind im Gang.

### Herstellung von Negersaat-Kreatinin-Substrat

Dextrose 10,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 g; Kreatinin 1,0 g; Negersaat<sup>2)</sup>, feinpulverisiert im Starmix 50,0 g; Agar 15,0 g; Aqua dest. 1000,0 ml; keine pH-Einstellung. Nach Verflüssigung und 30 Min. Kochen durch mehrere Lagen Gaze möglichst klar filtrieren, dann 30 Min. bei 110 °C sterilisieren. Nach Abkühlung des Nährbodens bis auf etwa 50 °C erfolgt Antibiotikazusatz:

1. Streptomycinsulfat 40 E/ml
2. Penicillin-G 20 E/ml
3. Chloramphenicol 1 mg/ml

Streptomycinsulfat 1 g (= 1 Mill. E) in 25 ml sterilem Aqua dest. gelöst, (= 40000 E/ml), davon 1 ml auf 1000 ml Nährsubstrat = 40 E/ml.

Penicillin-G 200000 E wird in 10 ml sterilem Aqua dest. gelöst, (= 20000 E/ml), davon 1 ml auf 1000 ml Nährsubstrat = 20 E/ml.

Je 1 ml der obigen Streptomycin- und Penicillinlösung sowie 1 g Chloramphenicol-Substanz werden unter sterilen Kautelen in etwa 100 ml vom obigen abgekühlten Nährboden gelöst, gut gemischt und anschließend der übrigen Nährbodenmenge (ad 1000 ml) zurückgegeben. Nach gutem Mischen des Ganzen werden Platten gegossen.

Auf Grund neuerer Untersuchungen können anstelle von Negersaat auch *die Früchte* anderer Kompositen, z.B. Sonnenblume, Löwenzahn usw. verwendet werden (2).

### Literatur

1. BARTSCH, A.: Untersuchungen zum Braunfarbeffekt bei *Cryptococcus neoformans* durch Saat und Pflanze. Dissertation, Würzburg, 1964.
2. BARTSCH, A., u. STAIB, F.: Naturwiss. **52**, 477 (1965).
3. DEMOULIN-BRAHY, L.: Acta Tuberc. et Pneumol. Belg. **53**, 184-193 (1962).

<sup>1)</sup> Zwischenzeitlich wurde von den Autoren über den Diphenyl-Zusatz zu obigem Nährboden zwecks Schimmelpilzhemmung berichtet (1. Ann. Past. **110**, 792-793 (1966) 2. Mykologen-Tagung, Leipzig, April 1966 [im Druck]).

<sup>2)</sup> Negersaat ist die Frucht der Komposite *Guizotia abyssinica* und ist in jeder Vogelhandlung erhältlich.

4. KAUFMAN, L., and BLUMER, S.: *Sabouraudia* **4**, 57–64 (1965).
5. KREGER-VAN RIJ, N. J. W.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **27**, 59–64 (1961).
6. PARTRIDGE, L.: Vortrag beim Inaugural meeting of the British Society for Mycopathology, Birmingham/England, 6th April, 1965.
7. SEELIGER, H.: *Mykologische Serodiagnostik. Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie*, Heft 11, Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig, 1958.
8. SEELIGER, H., and SCHRÖTER, R.: *Sabouraudia* **2**, 248–263 (1963).
9. SEELIGER, H.: *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **44**, 657–672 (1964).
10. STAIB, F.: *Zbl. f. Bakt. I Orig.* **182**, 562–563 (1961).
11. — *Z. Hyg.* **148**, 466–475 (1962).
12. — *Z. Hyg.* **149**, 329–335 (1963).
13. — *Mycopathologia* **19**, 143–145 (1963).
14. — *Zbl. f. Bakt. I Orig.* **191**, 429–432 (1963).
15. TSUCHIYA, T., KAWAKITA, S., u. UDAGAWA, M.: *Sabouraudia* **2**, 209–214 (1963).
16. UTZ, J. P., u. BUTLER, W. T.: *Dtsch. med. Wschr.* **90**, 941–943 (1965).
17. WIEBECKE, B., u. STAIB, F.: *Münch. Med. Wschr.* **107**, 361–365 (1965).
18. WOLFRAM, S., u. ZACH, F.: *Arch. Dermatol. u. Syphil.* **170**, 681 (1934).

Priv.-Doz. Dr. Dr. F. STAIB,  
Prof. Dr. H. P. R. SEELIGER  
Institut f. Hygiene und Mikrobiologie  
der Universität  
87 Würzburg, Jos.-Schneider-Str. 2