

# BEITRÄGE ZUR HYGIENE UND EPIDEMIOLOGIE

HERAUSGEGEBEN VON

PROF. DR. HORST HABS

PROF. DR. DR. h. c. JOHANNES KATHE

HEIDELBERG

ROSTOCK

---

HEFT 11

## MYKOLOGISCHE SERODIAGNOSTIK

VON

PRIVATDOZENT

DR. H. P. R. SEELIGER

HYGIENE - INSTITUT DER RHEINISCHEN  
FRIEDRICH - WILHELMS - UNIVERSITÄT  
BONN AM RHEIN



1 9 5 8

JOHANN AMBROSIUS BARTH / VERLAG / LEIPZIG

# MYKOLOGISCHE SERODIAGNOSTIK

VON

PRIVATDOZENT

DR. H. P. R. SEELIGER

HYGIENE-INSTITUT DER RHEINISCHEN  
FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT BONN AM RHEIN

MIT EINEM GELEITWORT VON

PROF. Dr. O. GRÜTZ

UNIVERSITÄTS-KLINIK FÜR HAUTKRANKHEITEN  
BONN AM RHEIN

MIT 82 ABBILDUNGEN IM TEXT



1 9 5 8

JOHANN AMBROSIUS BARTH / VERLAG / LEIPZIG

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe  
und der Übersetzung, vorbehalten

© 1957 by Johann Ambrosius Barth, Leipzig

Printed in Germany

Satz und Druck von Oswald Schmidt KG, Leipzig, III/18/65

Lizenz-Nr. 285/125/79/57

## Zum Geleit

Das vorliegende Werk wird von allen Klinikern und Ärzten, die sich mit Mykosen und ihren mannigfachen Problemen beschäftigen, wie eine Erlösung aus vielen Schwierigkeiten und ungeklärten Fragen empfunden werden, weil es zum ersten Male den heutigen Wissensstand darüber zusammenfaßt, was die *Serodiagnostik* und ihre Methoden (Präzipitation, Agglutination, Komplementbindung usw.) auf dem in allen medizinischen Disziplinen und in der ganzen Welt überhaupt immer größer und wichtiger werdenden Gebiete der *mykotischen Infektionen* leistet, was man von ihr erwarten darf und was nicht. Jeder Arzt, der sich um die diagnostische Klärung lokalisierter, gummöser Mykosen oder mykotischer Allgemeininfektionen bemüht hat, weiß, daß in Anbetracht der oft beträchtlichen Schwierigkeiten des direkten Nachweises der jeweilig in Frage kommenden Pilzarten eine *spezifische Serodiagnostik* der Mykosen ein höchst wünschbares diagnostisches Hilfsmittel darstellen würde, *wenn* sie einfach durchzuführen und in ihren Ergebnissen zuverlässig genug wäre, um als eine wirkliche diagnostische Stütze bewertet werden zu können. Inwieweit das der Fall ist, sucht das verdienstvolle Werk des Autors auf Grund eigener serologischer und umfänglicher experimenteller Bemühungen und unter Heranziehung der in der ganzen Welt darüber gesammelten Erfahrungen klarzustellen und, nach kritischer Überprüfung der wissenschaftlichen Grundlagen, auch die praktisch-klinische Verwendbarkeit der mykologischen Serodiagnostik auf einer breiteren Basis zu begründen, als sie uns bisher zu Gebote stand. Damit füllt das Buch ganz zweifellos eine seit Jahrzehnten schmerzlich empfundene Lücke aus und verdient schon deswegen nicht nur die Aufmerksamkeit der an diesen Problemen interessierten wissenschaftlichen Welt, sondern es ist auch als eine sicherlich höchst wertvolle Stütze für alle mykologisch-interessierten Ärzte zu begrüßen, weswegen man ihm eine weite Verbreitung wünschen muß.

Bonn, den 20. Juli 1957

O. GRÜTZ

## Vorwort

Wer sich mit der Diagnostik und Klassifizierung von Mikroorganismen beschäftigt, muß sich aller erreichbaren Hilfsmittel bedienen, die zuverlässig Aufschlüsse über die konstanten Merkmale vermitteln. In der Mykologie, dem ältesten Fachgebiet der Mikrobiologie, sind es seit jeher vornehmlich botanische Gesichtspunkte gewesen, die den Diagnostiker und Systematiker geleitet haben. Erst mit der Entwicklung der medizinischen Mykologie als selbständigem Wissenszweig sind auch klinische Gesichtspunkte Veranlassung geworden, Pilze nach ihrem Verhalten gegenüber dem Wirt näher zu untersuchen und einzuordnen. Und schon bald nach der Entdeckung der Antigen-Antikörper-Reaktion wurden zu Beginn dieses Jahrhunderts serologische Verfahren beim Studium von Pilzen und der durch sie verursachten Infektionskrankheiten angewandt.

Annähernd 50 Jahre sind seitdem vergangen, ohne daß es der Serologie gelungen wäre, in der klassischen Mykologie Fuß zu fassen, obwohl zahlreiche, allerdings weit in der Literatur verstreute Ergebnisse vorliegen. Erst neuere, systematisch durchgeführte Arbeiten und die zunehmende Kenntnis von den Pilzinfektionen bei Mensch und Tier – insbesondere von den generalisierten Mykosen mit ihren mannigfachen diagnostischen Problemen – haben die Serologie als Hilfsmittel der Mykologie und Mykopathologie aus ihrem Schattendasein ins rechte Licht gerückt.

Die Beschäftigung mit mykologisch-serologischen Fragen wird aber dadurch behindert, daß es bis heute keine zusammenfassende Darstellung dieses speziellen Gebiets gibt, so daß nur ein kleiner Kreis von Ärzten und Naturwissenschaftlern mit den Forschungsergebnissen vertraut ist.

Ausgehend von eigenen experimentellen Untersuchungen über die mykologische Serodiagnostik ist diese Schrift entstanden. Vor ihrer Abfassung bot sich Gelegenheit, im Rahmen einer ausgedehnten Studienreise als Stipendiat der Weltgesundheitsorganisation nicht nur die in Nordamerika geübten Arbeitsmethoden kennenzulernen, sondern auch den gesamten Fragenkomplex mit den dort tätigen Spezialisten eingehend zu erörtern. Natürlich ist es heute noch nicht möglich, die mykologische Serodiagnostik als ein abgeschlossenes Wissensgebiet zu behandeln. Aber ein Überblick über den augenblicklichen Stand wird dem Interessierten nicht nur unnötige Arbeit ersparen helfen, sondern ihm vielleicht auch manchen neuen Ausblick in ein noch wenig erschlossenes Arbeitsfeld eröffnen. Der Systematiker wird im serologischen Verhalten der Pilze manche Antwort auf bisher noch ungeklärte oder strittige Fragen erhalten. Und dem Arzt soll die Möglichkeit gegeben werden, sich rasch über die Bedeutung serologischer Befunde zu orientieren. Dem dient die vorliegende Schrift, in der durch zahlreiche Abbildungen versucht wird, dem mit der Materie nicht völlig Vertrauten die verschiedenen serologischen Phänomene anschaulich zu machen. Besonderer Wert wurde auf ein ausführliches Schrifttumsverzeichnis gelegt.

Dem Thema entsprechend wendet sich die Darstellung an einen weiten Kreis von Interessenten, insbesondere natürlich an Mykologen und Botaniker, nicht weniger aber auch an Ärzte und Tierärzte sowie Epidemiologen und Hygieniker, die sich im Laboratorium, am Krankenbett, in der Praxis oder in der freien Natur mit den Pilzen, ihren Wirkungen auf den lebenden Organismus und dessen immunbiologischen Reaktionen auseinandersetzen haben.

Zur Erleichterung der Übersicht ist der Inhalt so geordnet, daß nach einführenden Bemerkungen über die Problematik und die Grundlagen der Pilzserologie in drei Hauptteilen das Methodische, die rein mykologisch-serologischen Belange und die klinischen Probleme der mykologischen Serodiagnostik jeweils zusammenhängend abgehandelt werden. Wenn durch diese Aufteilung des Stoffes auch einzelne Überschneidungen unvermeidbar wurden, so hat sie doch den Vorteil, daß sich der Leser rasch über ein in sich abgeschlossen dargestelltes Gebiet orientieren kann.

Mein Dank für vielfältige Hilfe, wohlmeinende Kritik und freundschaftlichen Rat gilt zahlreichen Fachkollegen im In- und Ausland, insbesondere Frau Dr. Rh. Benham, New York, Ch. Campbell, Washington, D. C., Dr. L. Friedmann, New Orleans sowie den Herren Dr. Ch. Emmons und Dr. Howell, Bethesda, Md., Dr. N. F. Conant, Durham, N. C., Dr. D. T. Smith, Durham, N. C., Dr. L. Ajello, und Dr. L. Georg, Atlanta, Dr. Ch. Smith, Berkeley, Dr. E. E. Evans, Birmingham, Alab., Dr. S. Salvin, New York, und Dr. Ribí, Hamilton, Mont.

Dem Innenministerium der Deutschen Bundesrepublik und der Weltgesundheitsorganisation bin ich zu Dank verpflichtet für die mir gebotene Gelegenheit, den Stand der mykologischen Serodiagnostik in Nordamerika kennenzulernen.

Den Herausgebern dieser Schriftenreihe danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen, dem Verlag Johann Ambrosius Barth für das gezeigte Entgegenkommen und die ansprechende Ausstattung.

Bei der Durchführung der zahlreichen Arbeiten habe ich mich der unermüdlichen und aufopfernden Hilfe von Fräulein Friedel Sulzbacher erfreut; ihr herzlich zu danken, ist mir Bedürfnis.

Besonderer Dank gilt meinem Förderer, Herrn Prof. Dr. Dr. Eyer, dessen Anregung und Ermutigung diese Monographie ihre experimentelle Untermauerung verdankt.

Für die Bereitstellung von Mitteln zur Fort- und Weiterführung der Untersuchungen auf verbreiteter Grundlage habe ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft ebenfalls zu danken.

Möge das Buch dem Leser ein nützlicher Ratgeber und eine brauchbare Hilfe sein.

Bonn, Juli 1957

H. P. R. SEELIGER

## Inhaltsverzeichnis

Geleitwort .....	V
Vorwort .....	VI
I: Einführung .....	1
II: Grundlagen der Methodik .....	7
III: Untersuchungstechnik .....	27
A. Ausgangsmaterial .....	27
1. Pilzstämmе .....	27
2. Immunsereп .....	28
B. Untersuchungsmethoden .....	30
1. Agglutinationsprobe mit Vollantigen .....	30
2. Agglutinationsversuche mit sensibilisierten Teilchen .....	32
3. Kapselreaktion nach Neufeld .....	36
4. Präzipitationsversuche im flüssigen Milieu .....	37
5. Präzipitationsversuche im Agar-Gel .....	44
6. Komplementbindungsreaktion .....	47
7. Absättigungsversuche .....	53
8. Intrakutanreaktion mit Hauttestantigenon .....	54
9. Prüfung der fungistatischen Wirksamkeit von Serum .....	59
IV: Serologie der Pilze .....	60
A. Serologie der Strahlenpilze, (Aktinomyzeten, Nocardien, Streptomyzeten) .....	60
B. Serologie der Hefen .....	66
1. Asporogene Hefen .....	67
a) <i>Cryptococcus</i> -Gruppe .....	68
b) <i>Torulopsis</i> -, <i>Brettanomyces</i> - und <i>Kloeckera</i> -Gruppe .....	75
c) <i>Candida</i> -Gruppe .....	76
d) <i>Rhodotorula</i> -Gruppe .....	83
e) <i>Trichosporon</i> - und <i>Geotrichum</i> -Gruppe .....	85
2. Askosporogene Hefen .....	89
3. Ballistosporogene Hefen .....	97
C. Serologie der Hyphomyzeten .....	99
1. Dimorph wachsende Hyphomyzeten .....	99
2. Hyphomyzeten ohne hefeähnliches Wachstum .....	112
D. Serologie höherer Pilze .....	119
E. Besprechung der Ergebnisse und Ausblick .....	120
V: Serologie der Mykosen .....	124
A. Allgemeine Vorbemerkungen .....	124
B. Spezielle Immunbiologie der Mykosen .....	126
1. Infektionen mit Strahlenpilzen .....	126
2. Infektionen mit Sproßpilzen .....	128
3. Infektionen mit Hyphomyzeten .....	136
C. Die Lungenmykosen und ihre Immunbiologie .....	162
D. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	164
Schrifttum .....	169
Sachverzeichnis .....	182

## I. Einführung

Die Pilzkrankheiten des Menschen sind seit ihrer Entdeckung eine fast ausschließliche Domäne der Dermatologie und Tropenmedizin. Obwohl Virchow (<sup>484</sup>) schon vor über hundert Jahren den Begriff der *Mykose* geprägt hat und zahlreiche grundlegende Untersuchungen auf Pathologen und Kliniker zurückgehen, hat sich die medizinische Mikrobiologie erst relativ spät mit den Pilzen befaßt. Die ersten, eingehend beschriebenen Infektionserreger waren Pilze und wurden von Klinikern entdeckt. Die Entwicklung der *medizinischen Mykologie* geht deshalb von der Klinik aus. Französische Forscher haben hieran einen hervorragenden Anteil, und das Anfang dieses Jahrhunderts erschienene Werk von Sabouraud hat noch nichts von seiner Bedeutung eingebüßt (<sup>378</sup>). In Deutschland wurde die medizinische Mykologie durch das Wirken von H. C. Plaut und O. Grütz begründet, denen nicht nur umfassende Darstellungen über die pathogenen Pilze und die Pilzkrankheiten, sondern auch die Entwicklung der heute noch bevorzugten Züchtungsmethoden unter Verwendung von Nährböden aus einheimischen Bestandteilen zu verdanken sind (<sup>174, 175, 176</sup>).

Nun mehren sich aber schon seit geraumer Zeit, zunächst in Nordamerika, neuerdings auch in Südamerika und Afrika, Berichte über *generalisierte Pilzinfektionen bei Mensch und Tier* sowie über *isolierte Organmykosen* (<sup>337, 446 u. a.</sup>). Beide bereiten – im Gegensatz zu den Verpilzungen der Haut und ihrer Anhangsgebilde – hinsichtlich ihrer Erkennung und Abgrenzung von klinisch ähnlich verlaufenden Prozessen nicht unbeträchtliche Schwierigkeiten.

Das führte zwangsläufig dazu, die sich abzeichnenden Fragen auch von der immunbiologisch-serologischen Seite her anzugehen.

Wer sich mit der Immunbiologie von Pilzinfektionen beschäftigt und dabei von den Dermatomykosen absieht, wird im deutschen Schrifttum nur wenige Hinweise finden, die als Richtlinien für die einzuschlagende Technik und Methodik dienen könnten. Noch weniger wird er über die Antigenstruktur der pathogenen wie apathogenen Pilze erfahren. Demgegenüber finden sich im anglo-amerikanischen Schrifttum zahlreiche einschlägige Beiträge, denen sich erst in jüngster Zeit Arbeiten aus dem deutschen Sprachraum hinzugesellt haben.

Es war für alle Untersucher naheliegend, Erfahrungen aus anderen Gebieten der medizinischen Mikrobiologie und Serologie heranzuziehen und ihre Eignung auch bei Antigen-Antikörper-Reaktionen von Pilzen zu erproben mit dem Ziel, Näheres über den Antigenaufbau und damit auch über mögliche phylogenetische Zusammenhänge zu erfahren. Darüber hinaus konnten die im Modellversuch gesammelten Erfahrungen nutzbringend beim Nachweis humoraler Antikörper gegen Pilze bei Mensch und Tier ausgewertet werden.

Zahlreiche, oft enttäuschende Versuche waren nötig, um zunächst einen Einblick in die Materie und die besonders gelagerten Verhältnisse zu gewinnen, die sich in mancher Hinsicht von den Gegebenheiten der Bakteriologie unterscheiden. Schließlich gelang es aber doch, weitgehende Klarheit über die anzuwendende Methodik, deren Möglichkeiten, Grenzen und Fehlerquellen zu erhalten.

Die Zukunft wird lehren müssen, wo und in welchem Umfang die Erfahrungen einer so großen Zahl von Untersuchern noch ausbaufähig sind. Schon jetzt darf festgestellt werden, daß wirkliche Bereicherungen unseres Wissens auf dem Gebiet der mykologischen Serodiagnostik nur dann erwartet werden können, wenn – in noch größerem Umfang als bisher – konsequent die Antigenstruktur der Pilze weiter erforscht wird und sorgfältig geplante Untersuchungen an einschlägigem Krankengut vorgenommen werden – in ausgewogener Zusammenarbeit zwischen Klinik und Laboratorium.

Die zusammengestellten Ergebnisse werden daher nichts Abschließendes bringen; sie sind vielmehr ein Anfang, ein zunächst tastender, dann aber immer sichererer Schritt in ein Forschungsgebiet, dessen ganze Bedeutung sich erst in den letzten Jahren erschlossen hat. Was nachfolgend mitgeteilt wird, wurde teilweise mit einfachsten Mitteln und nur ausnahmsweise mit einem beachtlichen Einsatz moderner Laboratoriumsmethoden erreicht. Es soll als Grundlage für künftige Arbeiten dienen und vielleicht auch einige Anregungen für das Studium der von Bloch<sup>(34, 35, 36)</sup> zuerst bearbeiteten Immunbiologie der Mykosen vermitteln.

Es war schon davon die Rede, daß zur Zeit die *generalisierten Pilzkrankungen* des Menschen im Blickpunkt klinischer und mikrobiologischer Forschung stehen; zum Teil ist dies eine direkte Folge der allgemeinen Verbesserung der diagnostischen Methoden und Möglichkeiten. Hierdurch gelingt die Erkennung mykotischer Prozesse heute leichter als früher. Zum Teil ist diese Entwicklung aber auch bedingt durch unerfreuliche Erfahrungen bei der Chemotherapie bakterieller Infektionskrankheiten. Denn es ist erwiesen, daß die Behandlung mit antibiotischen Mitteln – vor allem, wenn sie in hohen Dosen über längere Zeiträume hinweg verabfolgt werden – gelegentlich zu erheblichen Verschiebungen des biologischen Gleichgewichts an den normalerweise mit Bakterien und Pilzen besiedelten Stellen des Körpers führt. Durch die oft weitgehende Ausschaltung der das Pilzwachstum hemmenden Bakterienflora finden saprophytäre und opportunistisch-pathogene Pilze Gelegenheit zum Wuchern und können unter bestimmten Voraussetzungen in das Gewebe eindringen. Man muß sich allerdings davor hüten, die pathogenetische Bedeutung von Pilzen zu überschätzen; denn die Erfahrung lehrt, daß sich die Verhältnisse in der Regel rasch normalisieren, wenn die antibakteriellen Mittel abgesetzt werden. Es besteht bisher auch kein sicherer Beweis dafür, daß einzelne antibiotische Substanzen direkt das Wachstum von Pilzen zu stimulieren vermögen, wodurch natürlich eine zusätzliche Gefährdung – vor allem des in seiner Resistenz geminderten Organismus – entstehen würde.

Wenn auch die Diskussion über die zuletzt angeschnittenen Fragen noch im Fluß ist und vor allzu einseitigen Beurteilungen mit Recht gewarnt wird, so sehen sich *Kliniker und Mikrobiologen immer häufiger vor mykologische*

*Probleme gestellt*, denen oft genug unzureichende diagnostische Möglichkeiten und mangelnde Erfahrung gegenüberstehen.

Eine der *Hauptschwierigkeiten* beim Studium der Pilze liegt im *Formenreichtum* und der *Vielzahl der Arten* (über 5000 Genera und mehr als 80000 benannte Arten!) begründet. Die Verwirrung in der Namensgebung und Systematik – für manche Arten sind mehr als 100 verschiedene Bezeichnungen bekannt – macht selbst dem mit der Materie Vertrauten das Studium schwer. Wenn auch die pathogenen Pilze einer relativ kleinen Zahl von Familien und Geschlechtern im Sinne der mykologisch-botanischen Taxonomie zugeordnet werden können, gibt es innerhalb dieser Gruppen oft zahlreiche Arten, Abarten und Varianten, so daß für human- und veterinärmedizinische Belange einige hundert Pilzarten in Betracht kommen (1, 50, 64, 79, 174, 241, 246, 308, 336, 337, 378, 428, 515 u. a.).

Ihre Erkennung und Abgrenzung von ähnlichen bzw. verwandten Arten mit und ohne humanmedizinische Bedeutung wird durch *spezielle Untersuchungsmethoden* ermöglicht, die außer der Prüfung des morphologischen, kulturellen und physiologisch-biochemischen Verhaltens die zeitraubende Beobachtung sexueller Vorgänge erforderlich machen. Deshalb müssen die Untersuchungen vielfach über mehrere Monate hinweg ausgedehnt werden, ehe eine Art- oder Typdiagnose mit hinreichender Sicherheit gestellt werden kann.

Die von Sabouraud<sup>(378)</sup> eingeführte und bei uns vor allem von Grütz<sup>(176)</sup> ermöglichte *Standardisierung von Pilznährböden* hat entscheidend zur Erzielung vergleichbarer Ergebnisse beigetragen. Hinzu kamen laufende Verbesserungen der *Darstellungsmöglichkeiten*, durch die nicht nur das Auffinden von Pilzelementen im Gewebe wesentlich erleichtert wurde, sondern auch genaue Vorstellungen von der Innenstruktur der Pilze und den morphologisch erfaßbaren Lebensvorgängen gewonnen werden konnten. Durch Einschaltung *biochemischer Testverfahren* (Gär- und Assimilationsproben usw.) wurde die Methodik weiter verfeinert und bei den pathogenen Pilzen durch *biologische Versuche am Tier* und den *Nachweis von Antikörpern* ergänzt.

Der durch die Pilzinfektion gesetzte antigene Reiz wird vom Körper nach verschieden langem Zeitintervall *immunbiologisch* beantwortet. Dies äußert sich in der Entstehung einer Überempfindlichkeit gegen bestimmte Bestandteile der komplexen Pilzantigene. Die hierfür verantwortlichen *allergischen Vorgänge* sind bei zahlreichen oberflächlichen, tiefen und generalisierten Mykosen bereits gut durchforscht. Die Umstimmung des Wirtsorganismus wird im *Intrakutantest* geprüft, ein Verfahren, das breiteste klinische Anwendung gefunden hat. Die erforderlichen Testsubstanzen – wie Trichophytin, Oidiomycin, Histoplasmin, Blastomycin u. a. – sind zum Teil im Handel erhältlich und soweit standardisiert, daß die Ergebnisse konstant und damit vergleichbar sind. Die Erforschung dieses Gebiets ist untrennbar mit den Arbeiten Bruno Blochs verknüpft<sup>(34, 35, 36)</sup>.

Was demgegenüber die mykologische *Serodiagnostik* betrifft, so fällt auf, daß sie sowohl bei der Artendifferenzierung der Pilze als auch bei der Diagnostik der Mykosen nur zögernd verwandt wird und als Routineverfahren in Europa bis heute keinen Eingang gefunden hat. Selbst in neueren euro-

päischen Standardwerken wird sie nicht oder nur andeutungsweise berücksichtigt.

Diese Tatsache ist insofern überraschend, als der Wert serologischer Verfahren in anderen Bereichen der Mikrobiologie seit Entdeckung der Antigen-Antikörper-Reaktion durch Gruber und Widal sowie der Entwicklung der Präzipitations- und Komplementbindungsreaktionen generell anerkannt ist. Ohne die serologischen Hilfsmittel sind wichtige Teilgebiete mikrobieller Forschung heute nicht mehr denkbar. Und bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten, beim Studium immunbiologischer Fragen sowie bei der Klärung epidemiologischer und epizootologischer Zusammenhänge haben die indirekten serologischen Nachweismethoden beträchtliche Bedeutung erlangt und sich – im Ganzen gesehen – bewährt.

Natürlich hat es nicht an zahlreichen *Versuchen* gefehlt, serologische Verfahren in der Mykologie anzuwenden. Botaniker, Chemiker, Kliniker und Mikrobiologen haben unter den verschiedensten Gesichtspunkten Fragen der humoralen Antikörperbildung gegen Pilze bearbeitet, besonders intensiv zunächst im ersten Jahrzehnt dieses Jahrhunderts. So wurde versucht, ober- und untergärrige Hefen, Bier-, Wein- und Getreidehefen serologisch gegeneinander abzugrenzen (90, 186, 254, 280, 409, 410 u. a.), analog zum Vorgehen der Botaniker, die die eben entwickelte Präzipitationsreaktion zum Studium der Verwandtschaftsbeziehungen bei Getreidearten, Leguminosen, Gräsern und höheren Pilzen benutzten (27, 157, 234, 277, 278, 373 u. a.).

In den folgenden Jahrzehnten wurden immer wieder mykologische Fragestellungen mit serologischen Mitteln angegangen, aber praktisch nie konsequent verfolgt. Die *Ergebnisse* finden sich in der Weltliteratur weit verstreut und betreffen hauptsächlich Seroreaktionen gegen die Erreger der Aktinomykose, der Dermatomykosen verschiedenster Ätiologie, der Blastomykosen im weitesten Sinne, der Sporotrichose usw. Nur vereinzelt wurden serologische Verfahren zur Klärung systematischer Probleme benutzt. Die Befunde selbst sind insgesamt keineswegs einheitlich, oft sogar widersprechend. Sie haben im Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten von Jadassohn und Mitarbeitern (1928) sowie teilweise auch im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle, Kraus und Uhlenhuth (1927) von berufener Seite ihre erste zusammenfassende Darstellung und Kritik erfahren (8, 36, 49, 55, 174, 175, 255).

Von wenigen Ausnahmen abgesehen, wurde die Serologie „als ein nur wenig brauchbares Hilfsmittel“ der medizinischen Mykologie beurteilt. So schrieb noch 1928 Buschke und Josef: „Jedenfalls haben die Immunitätsreaktionen bei der Soorinfektion nur biologisches Interesse und keine praktische Bedeutung“, eine Stellungnahme, der man auch in neuesten Berichten nicht selten begegnet (79, 509).

Läßt sich dies für *alle* Mykosen verallgemeinern, oder hat diese zweifellos begründete Feststellung nur Berechtigung für die oberflächlichen Pilzinfektionen?

Im letzteren Falle wird man in Analogie zu anderen oberflächlichen Infektionen kaum eine Beteiligung des für die Antikörperbildung maßgebenden retikuloendothelialen Systems erwarten können. Auf jeden Fall haben serodiagnostische Methoden zur Erkennung von Mykosen in der Dermatologie bisher keine oder eine nur sehr untergeordnete Rolle gespielt, wohl hingegen die diagnostisch besser brauchbaren Hautreaktionen.

Durch die Arbeiten amerikanischer Autoren – insbesondere durch Henrici (428), Benham (22, 23), Martin und Mitarbeiter (289, 290), Conant und Mitarbeiter (76, 79), Howell (198, 199), Salvin (380–394), Neill c. s. (323–327), Evans c. s. (121–129), Campbell (57–61) u. a. – hat sich jedoch in den letzten 25 Jahren eine Reihe *neuer Gesichtspunkte* ergeben, die nicht nur zu einer *Wiederbelebung* der mykologischen Serodiagnostik geführt haben, sondern auch manche, früher wenig geübte Routinemethoden zum Tragen brachten. Hierdurch wurde für eine ganze Anzahl von Pilzinfektionen, die sich vorzugsweise in der Tiefe abspielen, die schon 1928 von Grütz vertretene Auffassung bekräftigt, wonach serologischen Untersuchungen bei Sporotrichosen und verwandten Krankheiten eine gewisse diagnostische Bedeutung zuerkannt wurde. Dem entsprechen auch die Befunde Nordéns (340).

Die kaum mehr überschaubare Zahl von Einzelberichten darf aber nicht darüber hinwegtäuschen, daß *einheitliche Richtlinien für die Bewertung serologischer Reaktionen bei Pilzinfektionen noch keineswegs bestehen*, daß *die Immunbiologie vieler Mykosen*, z. B. der Maduromykosen und ähnlicher Prozesse, *noch weitgehend unerforscht ist*, daß *serodiagnostische Methoden im Sinne der Gruber-Reaktion praktisch keine Anwendung finden*, und schließlich, daß nach wie vor *zahlreiche Widersprüche* auch in der neuen Fachliteratur *ungeklärt* sind.

Dies geht auch klar aus dem bisher einzigen Sammelreferat zu diesem Thema von Kligman und De Lamater (229) hervor, das sich auf nicht weniger als 199 Veröffentlichungen neueren Datums stützt, aber methodische Gesichtspunkte, die bei der Gegenüberstellung divergierender Befunde und Meinungen in Rechnung zu stellen wären, nur andeutungsweise berücksichtigt: *die Durchführung mykologisch-serologischer Untersuchungen erfolgte unter Anwendung verschiedenartigster Testverfahren, häufig ohne ausreichende Standardisierung der Methodik, meist mit heterogenem Ausgangsmaterial von Stämmen und Seren und leider nicht immer unter Beachtung unerläßlicher technischer wie theoretischer Voraussetzungen*, die für jede Art von Serodiagnostik erforderlich sind. Nur so erklären sich auch einzelne zurückhaltende bis skeptische Äußerungen in der neueren einheimischen Fachliteratur an Hand von Einzelbeobachtungen bei Mykosen, deren Serodiagnostik anderenorts bereits Selbstverständlichkeit geworden ist. – Berücksichtigt man ferner, daß serologische Untersuchungen mit Pilzen und Pilzantigenen oft erheblich *schwieriger* sind als ähnliche Teste mit Bakterien, wird die *vielfach mangelnde Übereinstimmung von Untersuchungsergebnissen* verständlich. Dazu kommt bei der Beurteilung derartiger Reaktionen in der Praxis die Abhängigkeit von der mehr oder weniger zufälligen Zusammensetzung des Krankenguts. Wie schon bemerkt, ist auch kaum zu erwarten, daß die humorale Antikörperbildung bei oberflächlichen oder nur kurz dauernden Erkrankungen etwa in gleicher Weise verläuft wie bei tiefen, chronisch-protrahierten und disseminierten Mykosen, die sich teilweise direkt im Retikuloendothel abspielen. Darüber hinaus muß damit gerechnet werden, daß die verschiedenen in Frage kommenden Pilzarten selbst in unterschiedlicher Weise befähigt sind, den Organismus zur Bildung homologer Antikörper anzuregen. Und schließlich darf nicht übersehen werden, daß das Reaktionsvermögen des Organismus individuellen Schwankungen unterliegt.

Die meisten Untersucher haben sich – von wenigen Ausnahmen abgesehen – dem serologischen Studium nur weniger Pilzarten zugewandt und daher einen entsprechend *kleinen* Sektor durchgearbeitet. Was dabei oft an Tiefe erarbeitet wurde, ging an Breite verloren. Die Aufklärung der Antigenstruktur eines Pilzes, z. B. des Soorpilzes, hat *für praktische Zwecke* nur dann Belang, wenn die antigenen Beziehungen zu anderen Pilzen desselben Genus, aber auch vieler anderer Genera ebenfalls ermittelt werden. – Bei der jeweils verschiedenen Methodik ist leider ein direkter Vergleich der Ergebnisse mehrerer Forschergruppen nur in Einzelfällen möglich. Die Arbeiten von Benham, Martin, Conant und Mitarbeitern haben hier einen gewissen Wandel angebahnt.

In Deutschland wurden im Verlauf der letzten 20 Jahre nur von wenigen Autoren serologische Pilzuntersuchungen vorgenommen, z. B. von Lentze und Mitarbeitern an Aktinomyzeten (<sup>187, 248–251, 427</sup>), von Kaufmann an Cryptokokken (<sup>218</sup>), von Hoffmeister c. s. an Sproßpilzen (<sup>195</sup>) sowie von Janke an Soorpilzen und anderen Erregern (<sup>207</sup>). Eine Gesamtdarstellung des Fragenkomplexes existiert – außer den Referaten von Richter (<sup>375</sup>) und Mohr (<sup>308</sup>), in denen die Serologie nur als Teilgebiet behandelt wird – bisher ebensowenig wie Laboratorien, die sich in größerem Ausmaß dieser Aufgabe widmen.

Angesichts dieser allgemeinen Situation in der medizinischen Mykologie, die durch eine *Zunahme mykologischer Fragestellungen in anderen Fachrichtungen* als der Dermatologie gekennzeichnet ist, unternahm der Verfasser (<sup>416</sup>) einschlägige Untersuchungen auf möglichst *breiter* Basis. Sie sollten – ungeachtet der schon vorliegenden Berichte – über folgende Fragen Aufschluß geben:

1. *Inwieweit und unter welchen Voraussetzungen werden im Modellversuch humorale Antikörper gegen Pilze gebildet?*
2. *Sind die Reaktionen spezifisch und wo liegt die Grenze der Spezifität?*
3. *Eignen sich serologische Methoden zur Erkennung, zur Art- und Typenbestimmung von Pilzen?*
4. *Welche Verfahren verdienen den Vorzug?*
5. *Sind Seroreaktionen in der Praxis zur Diagnostik und Beurteilung bestimmter Pilzinfektionen brauchbar?*

Alle diese Fragen konnten klar beantwortet werden. Es ist jedoch nicht beabsichtigt, im folgenden lediglich auf diese seit mehreren Jahren geübten Untersuchungen Bezug zu nehmen; vielmehr sollen die Ergebnisse einen Überblick über den *derzeitigen Stand der mykologischen Serodiagnostik* überhaupt vermitteln. Die eigenen Befunde werden daher, an die Resultate früherer Untersucher anknüpfend, in vielen Punkten durch neuere Ergebnisse ergänzt und erweitert abgehandelt werden.

## II. Grundlagen der Methodik

Die Anwendung serologischer Verfahren in der Mykologie setzt die Beherrschung der methodischen Grundlagen voraus, über die neuere Lehrbücher umfassend Aufschluß geben (<sup>216, 366</sup>). Alle Untersucher, die sich mit mykologischer Serodiagnostik näher befaßten, sind sich darüber einig, daß die Auswahl geeigneter Testmethoden umfangreiche *orientierende Versuche* erfordert, von denen einige, für den Untersuchungsgang grundsätzlich wichtige, ebenso beschrieben werden sollen wie die Überlegungen, die ihnen zugrunde liegen.

Unerläßliche Vorbedingung für die *Entwicklung und Anwendung geeigneter Testverfahren* im Modellversuch wie in der Routine ist die Gewinnung stabiler Antigene und hochwertiger Immunsereen für analytische und vergleichende Untersuchungen. Antigenherstellung und Immunsereumgewinnung ergänzen sich beim experimentellen Versuch gegenseitig; denn Wert und Brauchbarkeit eines Antigens werden erst meßbar, wenn ein entsprechendes Antiserum zur Verfügung steht.

Vorversuche über die *Brauchbarkeit bestimmter Nährböden* können bei dem heutigen Stand der Kenntnisse auf ein Mindestmaß beschränkt werden. In der Regel erfüllen die in der Mykologie üblichen Substrate alle Anforderungen zur Gewinnung brauchbarer Antigene. Gewisse Schwierigkeiten können sich einstellen, wenn aus bestimmten Gründen blut- oder serumhaltige Medien zur Antigenbereitung benutzt werden, da auch trotz mehrmaligen Waschens der Abschwemmungen noch nährbodeneigene Eiweiße zurückbleiben können, die bei intravenöser Injektion derartiger Antigen-suspensionen die Bildung auch anderer als gegen die Pilze gerichteter Antikörper zur Folge haben. Grundsätzlich zu empfehlen ist die Verwendung halb- oder vollsynthetischer Substrate, deren Zusammensetzung weitgehend konstant gehalten werden kann. Dies gilt besonders für die Antigengewinnung von Pilzarten, die hinsichtlich der Nährbodenzusammensetzung erhöhte Ansprüche stellen. Ein solches Medium wurde von Salvin (<sup>381</sup>) angegeben und hat sich in einer Modifikation (<sup>385</sup>) vorzüglich bewährt.

Es hat folgende Zusammensetzung:

Difco casamino acids (technical)	10,0 g
Dextrose	3,0 g
NaCl	2,5 g
Cysteinhydrochlorid	0,5 g
KCl	2,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)	4,0 g
Hefeextrakt-Dialysat	3,0 g

*Herstellung:* Die Substanzen werden in der angegebenen Reihenfolge in 1000 ml destillierten Wassers gelöst und auf ein  $p_{\text{H}}$  von 7–7,2 eingestellt. Sterilisation 20 Minuten im Autoklaven bei 1,1 atü.

An Stelle des Hefeextrakt-Dialysats wurde in einem ähnlichen Medium Salvins Biotin verwandt (20 microgr/l Substrat) <sup>(387)</sup>.

Die *Züchtungsmethodik* wird von der jeweiligen Pilzart bestimmt: bei den meisten *Sproßpilzen* genügt eine *Bebrütungsdauer* von 2–6 Tagen, bei den *Strahlenpilzen* (Streptomyzeten und Nocardien) von 10–20 Tagen und bei den *Hyphomyzeten* eine solche von 10–30 Tagen, um ausreichendes Wachstum bzw. reichlich Sporen oder Conidien für die *Antigengewinnung* zu erhalten. Die Verwendung überalterter Kulturen ist tunlichst zu vermeiden, da infolge autolytischer Prozesse der Antigengehalt in dem Pilzmaterial herabgesetzt sein kann. Als Faustregel kann gelten, daß die Kultur mit Erreichen des maximalen Wachstums und ihrer typischen Merkmale zur Antigenherstellung brauchbar ist. Dies gilt jedoch nicht, wenn man sich *lösliche* Reaktionsprodukte, beispielsweise für Intrakutanteste, herstellen will. Hierbei kommt es gerade darauf an, daß möglichst viel reaktionsfähige Pilzbestandteile in *Lösung* gehen. Deshalb werden hierzu die Bebrütungszeiten in der Regel auf 2–6 Monate ausgedehnt, und an Stelle der vielfach benutzten festen Nährböden treten flüssige Substrate.

Bei den langen Bebrütungszeiten machen sich sekundäre Verunreinigungen durch Bakterien und Pilze gelegentlich störend bemerkbar. Dies ist nur durch peinlich sauberes Arbeiten, durch dichte, aber trotzdem luftdurchlässige Verschlüsse und durch gleichzeitige Beimpfung mehrerer Kulturgefäße mit demselben Stamm zu vermeiden.

Deshalb wird man die Antigene nur in Ausnahmefällen in den leicht zu verunreinigenden Petri- oder Drigalskischalen herstellen. Bei kleinen Mengen ist die Züchtung in Kulturröhrchen, sonst in Kolleschalen oder in Erlenmeyerkolben ratsam. Zum Verschluss benutze man Wattestopfen, die in Sublimatlösung getaucht wurden, um so ein Einwandern von Milben zu verhindern. Darüber werden mit Hilfe eines dicht schließenden Gummiringes Pergamentpapierhüllen gebracht, die sich als zusätzlicher Schutz gegen Luftverunreinigungen gut bewährt haben.

Die Dauer der Bebrütung hängt u. a. von der Wahl der *optimalen Wachstumstemperatur* ab. Diese ist von Fall zu Fall zu ermitteln, indem die zur Antigenherstellung verwandten Stämme parallel bei 20–24 °C, bei 30–32 °C und bei 37 °C gezüchtet werden.

Einige Pilzarten zeigen einen ausgeprägten *Dimorphismus* (vgl. Abb. 1–8), der weitgehend von der Züchtungstemperatur, aber auch von der Nährbodenzusammensetzung und den herrschenden Feuchtigkeitsverhältnissen beeinflusst wird <sup>(383 u. a.)</sup>, [Zusammenfassung siehe bei Scherr und Weaver <sup>(405)</sup>]. Bei niederen Temperaturen zwischen 22 und 30 °C kommt es vorwiegend zur Ausbildung der saprophytären Wuchsform mit einem kräftig entwickelten Luftmyzel, bei 37 °C dagegen zur parasitären Phase mit hefeähnlichem Wachstum. Diesem Umstand ist bei der Antigenherstellung bestimmter Pilze – wie *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Blastomyces (Paracoccidioides) brasiliensis*, *Sporotrichum schenckii* und einzelnen *Dematium*-Arten – Rechnung zu tragen. Die Hefephase solcher Pilze sind als Antigen viel besser zu handhaben als die Myzelphasen, ganz abgesehen davon, daß der Umgang mit letzteren mit größerer Gefahr verbunden ist. Im übrigen bestehen, soweit man bis heute weiß, keine serologisch nachweisbaren Unterschiede zwischen den beiden Phasen. – Vielfach wird deshalb zunächst die *Umzüchtung* der in der Myzelphase vorliegenden

Kulturen in die Hefephase notwendig. Dabei leisten cystinhaltige Nährböden mit Blutzusatz, z. B. der Francis-Agar<sup>(57)</sup>, aber auch gewöhnlicher Blutagar und Hirn-Herz-Bouillon-Agar gute Dienste. Für *Blastomyces dermatitidis*, *Blastomyces brasiliensis* und bestimmte *Pullularia*-Arten genügt einfacher Fleischwasser-Pepton-Agar, sofern nur bei 37 °C bebrütet wird.

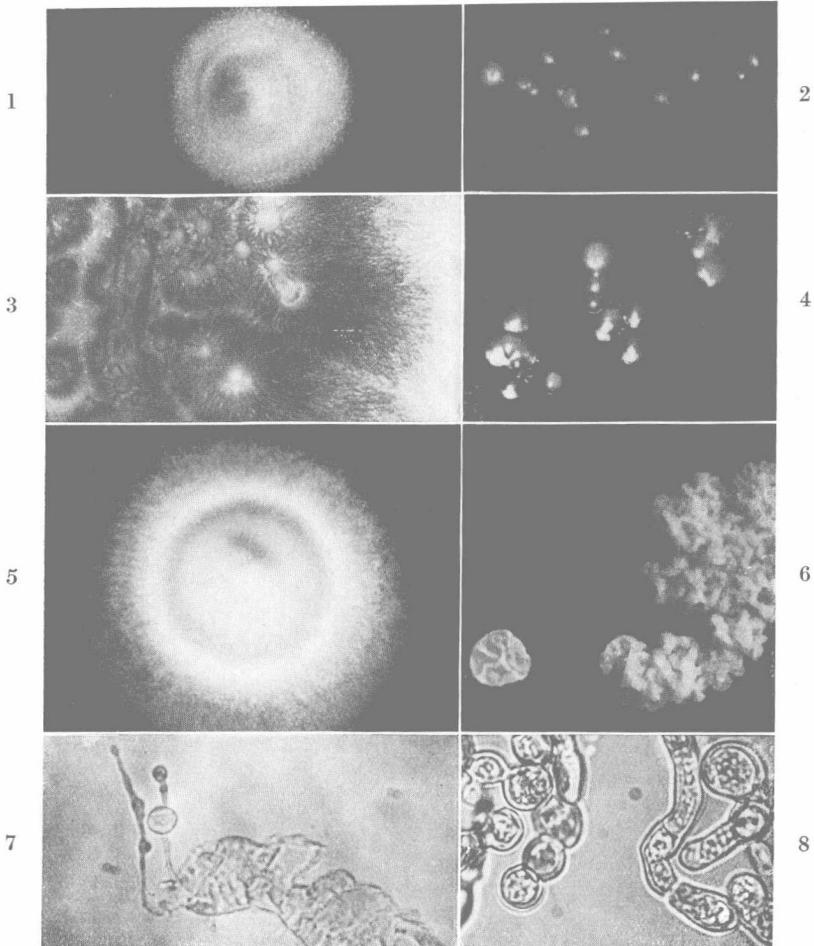


Abb. 1–8. Dimorphismus von Pilzen

1. Myzelphase, – 2. Hefephase von *Histoplasma capsulatum*
3. Myzelphase, – 4. Hefephase von *Pullularia pullulans*
5. Myzelphase, – 6. Hefephase von *Blastomyces dermatitidis*
7. Myzelphase, – 8. Hefephase von *B. dermatitidis* im mikroskopischen Präparat

Die Kulturröhrchen werden zur Vermeidung von Austrocknung am besten mit Gummi- oder Korkstopfen verschlossen. In der Regel erhält man in wenigen Passagen – im Abstand von fünf Tagen durchgeführt – gut suspen-

dierbare Hefephasen. Bei einzelnen, besonders schwer umzüchtbaren Kulturen kommt man rascher und sicherer zum Ziel, wenn man zunächst eine *Tierpassage* einschaltet (intraperitoneale Infektion der weißen Maus und anschließende Rückisolierung aus der Milz). Bei *Coccidioides immitis* läßt sich die parasitäre Phase (Sphärulen) noch nicht sicher *in vitro* züchten [vgl. aber <sup>(265)</sup>]. Man wählt hierbei den Umweg über infizierte Hühnerembryonen <sup>(486)</sup>, kommt damit aber nicht immer zum Ziel. – Die Mehrzahl der pathogenen Hyphomyzeten – einschließlich aller Dermatomyzeten – läßt sich überhaupt nicht in ein hefeähnliches Stadium überführen.

Im allgemeinen kommen nur *aerobe Kulturverfahren* zur Anwendung, bedingt durch das ausgesprochene Sauerstoffbedürfnis vieler Pilze. *Anaerobe Züchtungsmethoden*, z. B. Fortner-Verfahren, Züchtung im Anaerobiergefäß nach Zeissler oder Brewer oder in Thioglykollatbouillon nach Brewer, sind nur zur Antigengewinnung von strikt anaerob wachsenden *Actinomyces*-Arten, insbesondere *A. israeli*, erforderlich.

Wesentlich gesteigerte Antigenausbeute und verkürzte Bebrütungszeiten sind bei den aerob wachsenden Arten durch ständige Bewegung der Kultur und entsprechend verstärkte Belüftung in modernen *Schüttelapparaturen* zu erzielen. Salvin <sup>(385)</sup> hat diese Methode auch erfolgreich zur Züchtung von Hefephasen im flüssigen Substrat angewandt.

Zur künstlichen Immunisierung von Kaninchen, die sich zur Antiserumgewinnung von Pilzen gut eignen, werden lebende oder abgetötete Aufschwemmungen benutzt. Bei apathogenen Arten kann man ohne weiteres mit lebenden Antigenen arbeiten; bei pathogenen ist es ratsam, die Pilze mit physikalischen oder chemischen Mitteln zunächst abzutöten, es sei denn, daß aus bestimmten Gründen die Infektion der Versuchstiere angestrebt wird. Da dies nur beschränkt möglich ist (vgl. S. 18), kommen in der Regel zur Serumgewinnung abgetötete Antigene in Betracht. Diese müssen *homogen* oder wenigstens annähernd homogen sein.

Zur *Abtötung* der Antigene empfiehlt sich eine einstündige Erhitzung auf 80 °C mit nachträglichem Zusatz von Phenolkochsalzlösung (Endkonzentration 0,5%) oder ein Zusatz von Formalin zur lebenden Kultur (Endkonzentration 0,3–0,5%), gefolgt von zwei- bis dreitägiger Aufbewahrung bei 37 °C.

Durch die Besonderheiten des Pilzwachstums ist aber die *Homogenität* der Pilzsuspensionen häufig in Frage gestellt.

Die hierfür maßgebenden Verhältnisse seien an Hand einiger Beispiele näher erläutert, die sich auf drei charakteristische Vertreter der für die mykologische Serodiagnostik interessanten Pilze beziehen: *Nocardia asteroides* als Vertreter der aeroben Strahlenpilze, *Candida albicans* als Vertreter der Sproßpilze und *Trichophyton rubrum* als typischer Hyphomyzet.

Die Züchtung erfolge parallel auf 1%igem Dextrose-Pepton-Agar,  $p_H$  5,6, und auf 1%iger Dextrose-Peptonbouillon,  $p_H$  5,6, bei optimaler Bebrütungstemperatur, die für *N. asteroides* und *C. albicans* bei 37 °C und für *T. rubrum* bei 30 °C liegt. Die Bebrütung der flüssigen Kulturen werde zunächst ohne Schüttelapparat vorgenommen.

Dabei zeigen die drei Arten eine *unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit*: *C. albicans* bildet in 24–48 Stunden reichlich glatte Oberflächenkolonien von butterweicher Konsistenz und trübt die Bouillon gleichmäßig unter Bildung eines Bodensatzes. Die