

200

4.

**Zur Identifizierung von *Trichophyton mentagrophytes*
und *Trichophyton*
rubrum auf Glukose -und Peptonlösung.**

M. REFAI,* H. RIETH* und K. ITO**

* Univ. -Hautklinik Hamburg-Eppendorf (Dir.: Prof. Dr. Dr. J. Kimmig)

** Pharmaceutical Research Institute, Osaka-Takatsuki (Dir.: Prof. Dr. S. Matsumoto).

Reprinted from
Bulletin of Pharmaceutical Research
Institute, No. 54, Dec. 1964.

Zur Identifizierung von *Trichophyton mentagrophytes* und *Trichophyton rubrum* auf Glukose -und Peptonlösung.

M. REFAI,* H. RIETH* und K. ITO**

Die Unterscheidung zwischen *Trichophyton mentagrophytes* und *Trichophyton rubrum* ist in vielen Fällen schwierig, da es zwischen den beiden Arten Ähnlichkeiten und Übergangsformen gibt. Viele Autoren haben versucht, diese beiden *Trichophyton*-Arten voneinander abzugrenzen.

An Hand folgender Kriterien werden *Trichophyton mentagrophytes* und *Trichophyton rubrum* getrennt:

1. Morphologische Eigenschaften der Kultur (Habitus).
2. Morphologische Eigenschaften der in der Kultur gebildeten Mikro- und Makrokonidien.
3. Physiologische Eigenschaften.
4. Wachstum auf Peptonlösung.

1. Morphologische Eigenschaften der Kultur.

Die meisten *Trichophyton rubrum*-Stämme bilden ziemlich rasch wachsende schneeweiße, flaumige, halbkugelige Kolonien. Die Rückseite der Kolonie zeigt meist eine rötliche Färbung, die von der Art des Nährbodens, vom Alter der Kultur und von Eigenschaften des betreffenden Pilzstammes abhängig ist.

Trichophyton mentagrophytes wächst sehr rasch. Die Oberfläche der Kolonie ist anfangs samtig bis flaumig, weiß bis gelb oder pfirsichfarben. Später wird sie pulvrig bis gipsig. Die Rückseite ist hellgelb oder rötlich-braun. Manchmal wird die Kolonie mehr und mehr pleomorph. In diesem Fall ist es besonders schwierig, *Trichophyton mentagrophytes* von *Trichophyton rubrum* zu unterscheiden.

2. Morphologische Eigenschaften der in der Kultur gebildeten Mikro- und Makrokonidien.

Edgecombe, Benham sowie Böhme und Friedrich haben festgestellt, daß man auf Grund der Morphologie der Mikro- und Makrokonidien *Trichophyton mentagrophytes* von *Trichophyton rubrum* unterscheiden kann. *Trichophyton mentagrophytes* bildet runde bis birnenförmige Mikrokonidien, die vorwiegend in Haufen,

* Univ. -Hautklinik Hamburg-Eppendorf (Dir.: Prof. Dr. Dr. J. Kimmig)

** Pharmaceutical Research Institute, Osaka-Takatsuki (Dir.: Prof. Dr. S. Matsumoto).

aber auch entlang den Hyphen sitzen. Die Makrokonidien sind kurz, dick und keulenförmig.

Trichophyton rubrum produziert lange und birnenförmige Mikrokonidien, die vorwiegend entlang den Hyphen und selten in Haufen sitzen. Lewis und Hopper fanden, daß diese Kriterien in der Routine-Diagnostik oft nicht ausreichen, *Trichophyton mentagrophytes* von *Trichophyton rubrum* zu unterscheiden, denn die Makrokonidien sind nicht immer vorhanden und die Mikrokonidien beider Arten können einander sehr ähnlich sein. Ajello und Georg sowie Dyson und Landay stellten fest, daß die Makrokonidien nicht immer die gleiche charakteristische Form haben. Die für *Trichophyton mentagrophytes* typischen Makrokonidien können auch bei *Trichophyton rubrum* vorkommen und umgekehrt.

3. Physiologische Eigenschaften.

a. Farbstoffbildung.

Die Tatsache, daß einige *Trichophyton mentagrophytes*-Stämme auch rote Farbstoffe im Agar bilden können, ließ viele Autoren versuchen, einen Nährboden zu entwickeln, der nur *Trichophyton rubrum* Farbstoff bilden läßt. Auf Kartoffel-Agar bildete *Trichophyton rubrum* deutliche rote Farbstoffe (Böhme & Friedrich). Mais-Mehl-Agar und Mais-Mehl-Glukoseagar wurden von vielen Autoren empfohlen, da die meisten *Trichophyton mentagrophytes*-Stämme auf diesem Nährboden keinen roten Farbstoff bildeten (Benham, Bocobo & Benham, Benecke, Conant und seine Mitarbeiter sowie Hazen und Reed). Andererseits gibt es aber *Trichophyton rubrum*-Stämme, die keine Farbstoffe mehr bilden und auf diese Weise mit Hilfe der obigen Nährböden als *Trichophyton mentagrophytes* fehlidentifiziert werden können. Eine zuverlässige Bestimmungsmethode allein auf Grund der Farbstoffbildung fehlt bis heute noch.

b. Haar-Test.

Dieser Test ist von Ajello und Georg (1957) entwickelt worden. Er basiert darauf, daß *Trichophyton mentagrophytes* *in vitro* in das Haar eindringt, während die geprüften *Trichophyton rubrum*-Stämme unter den Versuchsbedingungen dies nicht taten, wie auch neuerdings wieder von Reichenberger in einer sehr sorgfältigen Arbeit bestätigt wurde.

Technik: 1 cm lange Haarstückchen wurden 10 Minuten in Petrischalen autoklaviert. Dazu wurden Aq. dest. und 2-3 Tropfen eines 10%igen sterilisierten Hefeextraktes gegeben. Die Lösung wurde mit der Testkultur beimpft und bei Zimmertemperatur bebrütet. Im Laufe von 4 Wochen wurden dann die Haarteilchen mehrmals mikroskopiert, um festzustellen, ob der Pilz das Haar angegriffen hatte oder nicht.

c. Vitaminbedürfnisse.

Georg und Camp (1957) haben festgestellt, daß einige *Trichophyton*-Arten wie z. B. *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton tonsurans* und *Trichophyton viola-*

ceum in ihrem Wachstum durch Vitamin B₁ stimuliert wurden. Nicotinsäure förderte das Wachstum von 13 geprüften *Trichophyton equinum*-Stämmen. Andere *Trichophyton*-Arten, wie *Trichophyton mentagrophytes*, wuchsen auf vitaminfreien Nährböden genauso wie auf mit Vitamin angereicherten Nährböden. Auf Grund dieser Feststellung versuchten Georg und Camp ähnliche *Trichophyton*-Arten voneinander zu trennen. Da *Trichophyton mentagrophytes* und *Trichophyton rubrum* auf vitaminfreien Nährböden gut wuchsen, konnten sie diese beiden Arten mit Hilfe von Vitaminnährböden nicht trennen.

4. Wachstum auf Peptonlösung.

10%ige Peptonlösung wurde zu je 7 ml in Röhrchen gegossen, im Autoklav sterilisiert und mit den Testkulturen beimpft. Nach 5 Tagen erfolgte die Beurteilung des Wachstums. Dieses Verfahren hat sich bei Götz besonders bewährt.

Eigene Untersuchungen.

Da sich in vielen Vorversuchen die Erfahrungen von Götz sehr nutzbringend auswerten ließen, verglichen wir das Wachstum von *Trichophyton mentagrophytes* und *Trichophyton rubrum* auf Glukoselösung mit dem Wachstum auf Peptonlösung.

Untersuchte Staemme.

143 *Trichophyton rubrum*-Stämme und 46 *Trichophyton mentagrophytes*-Stämme wurden geprüft. Diese Stämme wurden vorher in unserem Labor an Hand der makro- und mikroskopischen Merkmale auf verschiedenen Nährböden (Kimmig-Agar, Glukose- und Pepton-Agar) identifiziert.

<i>Glukoselösung</i>		<i>Peptonlösung</i>	
Glukose	20,0 g	Pepton	10,0 g
Pepton	10,0 g	Aq. dest. ad	100,0 ml
Aq. dest. ad	1000,0 ml		

pH: 6,4

Bromthymolblau als Indikator.

Die Lösung wurde zu je 7 ml in Röhrchen gegossen und im Dampftopf an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 30 Minuten sterilisiert. Ein stecknadelkopfgroßes Inoculum der Ausgangskultur der geprüften Stämme wurde auf die Lösung (ein Röhrchen pro Stamm) geimpft und alle 5 Tage einen Monat hindurch beobachtet. Die Bebrütung erfolgte bei Zimmertemperatur.

Ergebnisse auf Glukoselösung.

1. *Trichophyton mentagrophytes*.

Alle untersuchten *Trichophyton mentagrophytes*-Stämme wuchsen auf der Oberfläche der Glukoselösung. Schon innerhalb von 5 Tagen waren zahlreiche

sandkorngröße, weiße oder gelb-weiße Kugeln zu sehen, die teils auf der Oberfläche schwammen und teils an der Röhrenwand klebten. Diese kleinen Kolonien wuchsen weiter, sowohl auf der Oberfläche als auch am Rand entlang der Röhrenwand, flossen zusammen und bildeten eine Mulde. Wir beobachteten zwei Formen von Mulden:

- a. Die Mulde hatte eine graue und glatte oder weiße und watteartige Oberfläche.
- b. Die Mulde hatte eine gefaltete Oberfläche mit Einsenkungen, Vertiefungen und Kraterbildungen.

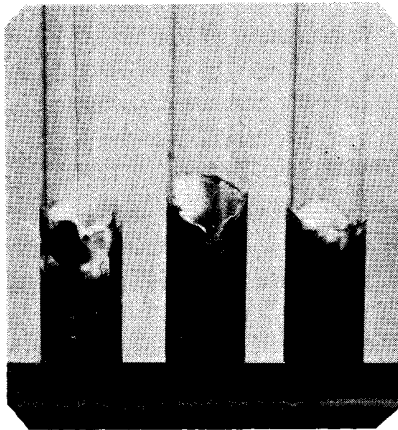


Abb. 1 *Trichophyton mentagrophytes* auf 2% Glukoselösung. Tiefe Mulde, die Oberfläche ist glatt.



Abb. 2 *Trichophyton mentagrophytes* auf 2% Glukoselösung. Die Oberfläche mit Einsenkungen und Krater.

Bei beiden Formen war die Unterseite unregelmäßig, höckerig und dunkelgrün oder braun. Je älter die Kultur war, desto deutlicher wurde die Kraterbildung und dunkler die Unterseite. Die Lösung war dunkelgrün oder blau gefärbt und der pH-Wert der Lösung von 6,4 auf 7,7 verschoben.

2. *Trichophyton rubrum*.

Von den 143 untersuchten *Trichophyton rubrum*-Stämmen wuchsen 96 auf der Glukoselösungsoberfläche, 37 sowohl auf der Oberfläche als auch submers und 10 nur submers. Diejenigen, die nur auf der Oberfläche wuchsen, bildeten eine kleine, hanfkorngröße, weiße Kolonie. Nach 3-4 Wochen war die Kolonie halbkugelig und bedeckte die ganze Oberfläche. (Abb. 3) Einige Stämme bildeten grüne, glatte und gummiartige Kolonien. Nach 2-3 Wochen bildete der Pilz stellenweise Konidien, und dort sah die Kolonie so aus, als sei sie mit Mehl bestäubt. *Trichophyton rubrum* zeigte stets eine glatte Unterseite, meist grün mit weißem oder gelb und weißem Rand. Mitunter war die Unterseite aber auch gelb. Auch wenn der Pilz an der Röhrenwand wuchs, konnte man die glatte, grüne Rückseite mit den weißen

oder weißen und gelben Rändern sehen.

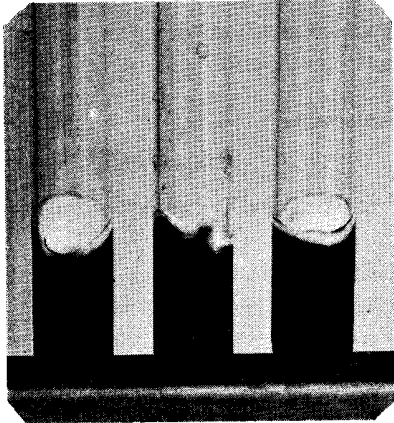


Abb. 3 *Trichophyton rubrum* auf 2% Glukoselösung. Weiße, halbkugelige Kolonie, die Unterseite hat einen weißen oder gelb-weißen Rand

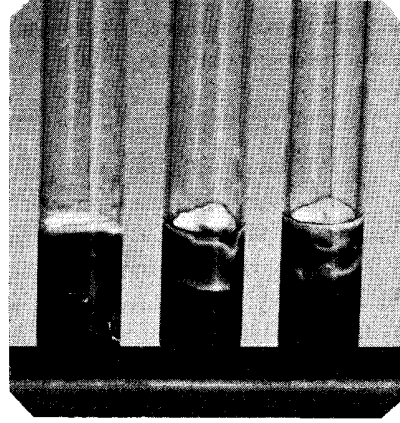


Abb. 4 *Trichophyton rubrum* auf 2% Glukoselösung. Wachstum auf der Röhrenwand mit 2 Rändern.

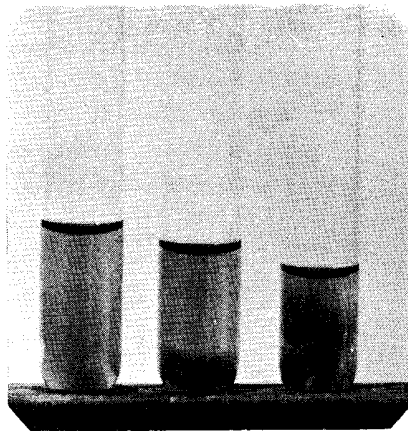


Abb. 5 *Trichophyton rubrum* auf 2% Glukoselösung. Submerses Wachstum.

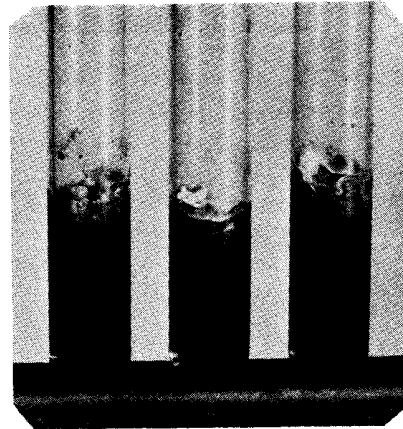


Abb. 6 *Trichophyton mentagrophytes* auf 10% Peptonlösung. Die Kolonie hat eine gefaltete Oberfläche.

Die 10 Stämme, die nur submers wuchsen, waren aus Impfgut entstanden, das innerhalb von 5 Tagen vollständig auf den Röhrenboden gesunken war. Dort ließen sich viele kleine, hellgrüne sternförmige Kolonien wahrnehmen. Die Sternchen bestanden aus sehr feinen, von einem gelben Punkt ausstrahlenden Hyphen. Die Lösung blieb im pH-Wert und in der Farbe unverändert.

Zum Vergleich haben wir die Test-Stämme auch auf der von Götz angegebenen 10%igen Peptonlösung geprüft. Die von Götz untersuchten *Trichophyton mentagrophytes*-Stämme wuchsen auf der Oberfläche, die *Trichophyton rubrum*-Stämme jedoch submers.

Ergebnisse auf Peptonlösung.

1. *Trichophyton mentagrophytes*,

Auf 10%iger Peptonlösung wuchsen alle untersuchten *Trichophyton mentagrophytes*-Stämme auf der Oberfläche.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Götz völlig überein. Das Wachstum von *Trichophyton mentagrophytes* auf dieser Lösung war sehr typisch. Nach 5 Tagen konnte man kleine, dünne, hellbraune, sesselähnliche, auf der Lösungsoberfläche wachsende Kolonien sehen. Nach 10-20 Tagen bedeckten die Kolonien die ganze Lösungsoberfläche. Diese Wachstumsweise ergab eine Kolonie mit gefältelter Oberfläche, die Einsenkungen und Vertiefungen zeigte.

2. *Trichophyton rubrum*.

Nach 5 Tagen zeigten die 143 untersuchten *Trichophyton rubrum*-Stämme folgende Ergebnisse:

Gruppe A : Submerses Wachstum nach 5 Tagen : 95 Stämme.

Gruppe B : Oberflächenwachstum nach 5 Tagen : 48 Stämme.

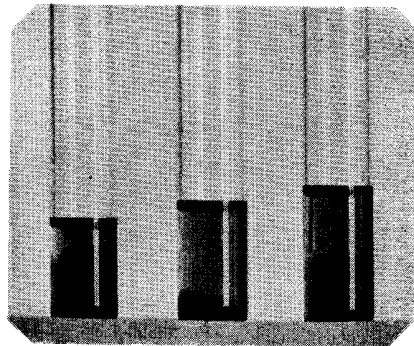


Abb. 7 *Trichophyton rubrum* auf 10% Peptonlösung. Submerses Wachstum.

Es ist sehr deutlich, daß 95 der geprüften *Trichophyton rubrum*-Stämme (Gruppe A) submers wuchsen. Auch diese Ergebnisse stimmen völlig mit denen von Götz überein. Von den 95 Stämmen wuchsen 57 immer auf dem Röhrchenboden, während 38 in der Schwebe zwischen Boden und Oberfläche wuchsen. 8 von diesen 38 Stämmen entwickelten sich zunächst dicht unter der Oberfläche, gelangten aber im Verlauf des weiteren Wachstums über den Flüssigkeitspiegel und dort bildeten sie Luftmycel, die anderen 30 Stämme sanken nach 10-15 Tagen auf den Röhrchen-

Tabelle 1. Wachstum von *Trichophyton rubrum* auf 10%iger Peptonlösung.

Gruppe	Wachstum der <i>Trichophyton rubrum</i> -Stämme			
	nach 5 Tagen	nach 10-15 Tagen	nach 30 Tagen	Zahl der Stämme
A ₁	B*	B	B	57
A ₂	S**	B	B	30
A ₃	S	O***	O	8
B ₁	O	B	B	21
B ₂	O	O	O	27

*B: Wachstum auf dem Röhrchenboden.

**S: Wachstum in der Schwebel zwischen Boden und Oberfläche.

***O: Wachstum auf der Oberfläche der Lösung.

boden. Auch von den 48 Stämmen (Gruppe B) mit anfänglichem Oberflächenwachstum sanken 21 nach 10-15 Tagen auf den Boden. Die übrigen 27 *Trichophyton rubrum*-Stämme blieben während der ganzen Beobachtungszeit von 30 Tagen auf der Peptonlösungsoberfläche. Nach 30 Tagen ergab sich also folgendes Bild:

Submerses Wachstum nach 30 Tagen: 108 Stämme.

Oberflächenwachstum nach 30 Tagen: 35 Stämme.

Erstaunlich war aber, daß ein Teil der anfänglich submers wachsenden-Stämme dort nicht verblieb, sondern aufstieg und später nur noch Oberflächenwachstum zeigte und Luftmycel bildete.

Alle *Trichophyton rubrum*-Stämme, die auf der Oberfläche der Peptonlösung wuchsen, hatten einen sehr charakteristischen Habitus, der mit dem von *Trichophyton mentagrophytes* nicht verwechselt werden konnte. Die Kolonien waren schneeweiß, flaumig und halbkugelig. Krater, Einsenkungen und Vertiefungen, wie

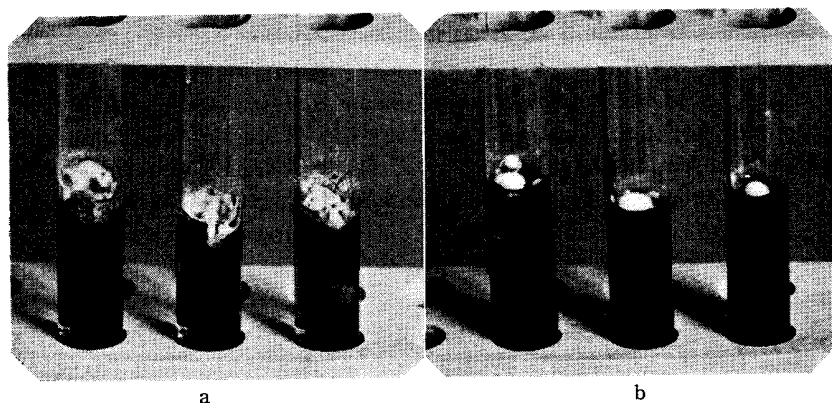


Abb. 8 a. *Trichophyton mentagrophytes* auf 10% Peptonlösung. Die Oberfläche ist gefaltet.

b. *Trichophyton rubrum* auf 10% Peptonlösung. Schneeweiße, halbkugelige Kolonie.

Trichophyton mentagrophytes sie bildete, wurden niemals bei diesen Trichophyton rubrum-Stämmen gesehen.

Zusammenfassung

Das Wachstum von Trichophyton mentagrophytes und Trichophyton rubrum wurde auf 2% Glukoselösung und zum Vergleich auf 10% Peptonlösung (nach Götz) geprüft.

Auf der Glukoselösung wuchsen alle 46 untersuchten Trichophyton mentagrophytes-Stämme auf der Oberfläche. Sie bildeten dort eine Mulde, die glatt wattenartig oder gefaltet mit Einsenkungen, Vertiefungen und Kraterbildung waren. Die Unterseite der Mulde war unregelmäßig, höckerig und dunkelgrün oder braun.

Von den 143 untersuchten Trichophyton rubrum-Stämmen wuchsen 96 auf der Glukoselösungsoberfläche. Sie bildeten weiße, halbkugelige Kolonien, die die ganze Oberfläche der Lösung bedeckten und deren Unterseiten stets glatt, meist grün mit weißem oder gelb und weißem Rand waren, mitunter war die Unterseite aber auch gelb. 37 Stämme wuchsen sowohl auf der Oberfläche als auch submers und 10 Stämme nur submers.

Auf 10%iger Peptonlösung wuchsen alle untersuchten Trichophyton mentagrophytes-Stämme (46 Stämme) auf der Oberfläche. Das Wachstum war sehr typisch. Sie bildeten kleine, dünne, hellbraune und sesselähnliche Kolonien, die nach 10–15 Tagen zusammen flossen. Diese Wachstumsweise ergab eine Kolonie mit gefalteter Oberfläche, die Einsenkungen und Vertiefungen zeigte.

Die 143 untersuchten Trichophyton rubrum-Stämme zeigten nach 5 Tagen folgende Ergebnisse:

95 Stämme wuchsen submers (Gruppe A₁-A₂) und 48 Stämme wuchsen auf der Oberfläche (Gruppe B₁-B₂). Von diesen 95 Stämmen wuchsen 57 immer auf dem Röhrchenboden, während 38 in der Schwebe zwischen Boden und Oberfläche wuchsen. 8 von den 38 Stämmen verblieben nicht submers, sondern stiegen auf und zeigten später nur Oberflächenwachstum, die anderen 30 Stämme sanken nach 10–15 Tagen auf den Röhrchenboden. Auch von den 48 Stämmen mit anfänglichem Oberflächenwachstum sanken 21 nach 10–15 Tagen auf den Boden. Die übrigen 27 Trichophyton rubrum-Stämme blieben während der ganzen Beobachtungszeit von 30 Tagen auf der Peptonlösungsoberfläche. Sie hatten aber ein so charakteristisches Aussehen, daß sie in keinem einzigen Falle mit Trichophyton mentagrophytes verwechselt werden konnten.

Damit sind die Erfahrungen von Götz über die besondere Eignung der Peptonlösung zur Differenzierung von Trichophyton mentagrophytes und Trichophyton rubrum auf breiter Basis bestätigt.

Literatur.

Ajello, L. & L.K. Georg: In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates

- of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopath., Mycol. Appl.* 7, 3-17 (1957)
- Benham, R.W.: Effect of nutrition on growth and morphology of the dermatophytes. I. Development of macroconidia in *Trichophyton rubrum*. *Mycologia* 40, 232-240 (1948)
- Benham, R.W.: Nutritional studies of the dermatophytes. Effect on growth and morphology, with special reference to the production of the macroconidia. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 15, 102-106 (1953)
- Bocobo, F.C. & R.W. Benham: Pigment production in the differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycologia* 41, 291-302 (1949)
- Böhme, H. & E. Friedrich: Erfahrungen mit einer einfachen Methode zur Untersuchung von *Trichophyton rubrum* und *Trichophyton mentagrophytes*. *Zbl. Bakt. Hyg.* 183, 541-553 (1962)
- Conant, N.F., D.T. Smith, R.D. Baker, J.L. Callaway and D.S. Martin: Manual of clinical mycology. W. B. Saunders Company, Philadelphia and London (1954)
- Dyson, J.E. & M.E. Landay: Differentiation of *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycopath., Mycol. Appl.* 20, 82-97 (1963)
- Edgecombe, A.E.: *Trichophyton purpureum* (Bang) and *Trichophyton gypseum* (Bodin). Differentiation in culture. *Arch. Derm. Syph. (Chic.)* 46, 651-660 (1942)
- Emmons, C.W.: Dermatophytes. Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. *Arch. Derm. Syph. (Chic.)* 30, 337-362 (1934)
- Georg, L.K. & L.B. Camp: Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. *J. Bact.* 74, 113-121 (1957)
- Götz, H.: Die Pilzkrankheiten der Haut durch Dermatophyten, in *Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten*, J. Jadassohn, Ergänzungswerk, Bd. IV, Teil 3. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)
- Lewis, G.M. & M.E. Hopper: Pigment production by fungi. I. Nutritional requirements. *Arch. Derm. Syph. (Chic.)* 44, 453-462 (1941)
- Polemann, G.: *Klinik und Therapie der Pilzkrankheiten*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. (1961)
- Refai, M. & H. Rieth: Wachstumsunterschiede zwischen *Trichophyton rubrum* und *Trichophyton mentagrophytes* auf Nagelkeratin *in vitro*. *Bull. Pharmaceut. Res. Osaka im Druck* (1964)
- Refai, M. & H. Rieth: Änderung des pH-Wertes der Nährböden durch Dermatophyten. *Zbl. Bakt. I Orig.* 194, 114-121 (1964)
- Reichenberger, M.: Persönl. Mitt.