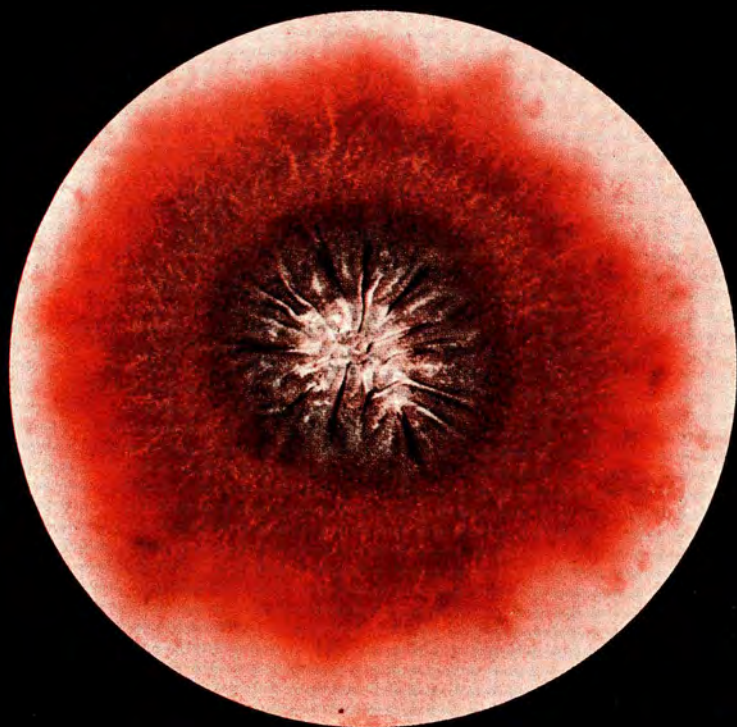


A 2547 E

mykosen

Herausgeber und Schriftleiter: Hans Götz, Essen, Heinz Grimmer, Wiesbaden
Detlev Hantschke, Essen, Wolf Meinhof, München, Hans Rieth, Hamburg



2/1970

1. Februar

Untersuchungen zur *Microsporum*-Fluoreszenz

HILDEGARD ZEHETMEIER, W. SCHNEIDER und LUISE KREMPL-LAMPRECHT

Aus der Entdeckung von MARGAROT und DEVÈZE (1925), daß dermatophyten-infizierte Haare im UV-Licht fluoreszieren, hat sich einerseits eine für die Praxis sehr nützliche Methode zur Erregerdiagnostik entwickelt: Aufgrund einer charakteristischen leuchtend-grünen Fluoreszenz kann eine *Microsporie* schon vor der Bestimmung des Pilzes mittels Kultur als solche erkannt werden.

Andererseits warf dieses Phänomen eine Reihe wissenschaftlich interessanter Fragen auf: Zu welchem Zeitpunkt nach der Infektion tritt eine Fluoreszenz auf? Ist sie auf die typische Sporenscheide, also den Pilz selbst, beschränkt oder erfaßt sie das ganze Haar? Ist ein parasitärer Haarbefall Voraussetzung, oder kann die Fluoreszenz auch beim saprophytischen Haarabbau *in vitro* erzeugt werden? Fluoresziert auch normales, nicht-infiziertes Haar im UV-Licht? Welchem Typ chemischer Verbindungen ist die fluoreszierende Substanz zuzuordnen?

Gesicherte Antworten sind erst auf die Frage nach dem Zeitpunkt (1) und der Lokalisation (2) möglich. Zu 1): Nach den Untersuchungen KLIGMANS (1952) fällt das Auftreten einer *Microsporum*-Fluoreszenz mit dem Eindringen der ursprünglich auf der Haaroberfläche wachsenden *Infektionshyphen* in das Haar zusammen. Zu 2): Nach DAVIDSON und GREGORY (1932) ist die Fluoreszenz *im* Haar lokalisiert und kann nach FELSHER (1949) mit Wasser daraus extrahiert werden, wobei Farbe und Intensität pH-abhängig sind.

Die bisherigen Aussagen zu den restlichen Fragen sind noch unvollständig oder umstritten.

Unsere Untersuchungen zielten darauf hin, durch verschiedene Vergleiche die Veränderungen zu erfassen, die mit dem Eindringen des Pilzes in das Haar verbunden sind, mit anderen Worten den *biologischen Ablauf des Haarabbaus in vivo und in vitro unter dem Gesichtspunkt des Auftretens einer Fluoreszenz zu charakterisieren*.

Dazu verglichen wir:

- A. Parasitisch und saprophytisch besiedelte Haare im Woodlicht.
- B. Nicht-infizierte und *in-vivo*-infizierte Haare mit Hilfe der Fluoreszenzspektren von Haaren direkt, ihrer wäßrigen Extrakte und deren chromatographischen Fraktionen.
- C. Die „Crithidia-Aktivität“ infizierter und nicht-infizierter Haare.

A. 1. Parasitischer Befall

Sämtliche Versuche wurden mit *Meerschweinchen als Versuchstieren* und *Microsporum canis* als der in diesem Falle zur Infektion geeignetsten Art durchgeführt.

Nach gelungener Infektion zeigten die epilierten Haare — mit mehr oder minder deutlich ausgeprägter Sporenscheide — auch noch nach mehrmonatiger Aufbewahrung eine *leuchtend-grüne Fluoreszenz*.

2. Saprophytischer Befall

Für die in-vitro-Kulturen wurden entfettete, sterilisierte, abgeschnittene Meerschweinchenhaare auf Czapek-Dox-Agar mit 1% Glukose gegeben und mit Sporen-Myzel-Material beimpft.

Bei der Prüfung nach ca. 2 Wochen trat im Nährboden und bei den anliegenden Haaren eine gelblich-grüne Fluoreszenz auf, die sich aber in Farbe und Intensität deutlich von der in vivo entstandenen unterschied. Bei der mikroskopischen Kontrolle zeigten die vorsichtig ausgesuchten „fluoreszierenden“ Haare keine Differenz gegenüber den anderen Haaren des Kolbens: z. T. waren sie völlig unverändert, z. T. vom Pilz angegriffen nach den bekannten Formen des saprophytischen Haarabbaus mit Kutikula- und Kortex-Löcherung, bzw. Perforation. Die Beimpfung *epilierter* Haare direkt auf die Haarwurzel — durchgeführt unter dem Aspekt, daß Haarwurzel und Haarspitze sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden — erbrachte keine veränderten Ergebnisse.

Wir deuten die Entstehung der beobachteten Fluoreszenz so, daß unter der Einwirkung der Sterilisationstemperatur fluoreszierende Verbindungen, die von Natur aus im Haar vorliegen, eine Umwandlung erfahren und dabei teilweise in Lösung gehen, so daß gleichzeitig eine Fluoreszenz von Nährboden und denjenigen Haaren auftritt, an denen diese Lösung hochdiffundieren kann. Dafür spricht ein Blindversuch, bei dem Nährboden- und Haarfluoreszenz schon *vor* der Pilzbeimpfung auftraten.

Die Möglichkeit, daß durch das saprophytische Pilzwachstum auf den bereits geringfügig veränderten Haarbestandteilen weitere zusätzliche Veränderungen erfolgen, die sich auch auf die Fluoreszenzstoffe auswirken, ist durch diese Beobachtung nicht ausgeschlossen.

B. Die Fluoreszenz nicht-infizierter und *Microsporum-canis*-infizierter Meerschweinchenhaare

Durch Messung der Fluoreszenz wollten wir Aufschluß über die Substanzen erhalten, die

1. von Natur aus im Meerschweinchenhaar vorliegen (= nicht-infizierte Haare);
2. nach dessen parasitärem Befall nachweisbar sind (= infizierte Haare).

Zu diesem Zweck wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen, und zwar von nicht-infizierten (unpigmentierten) und infizierten Haaren selbst, von ihren wäßrigen Extrakten, sowie von deren papierchromatographisch erhaltenen, ebenfalls in Wasser gelösten Fraktionen. Zum Vergleich wurden Spektren von solchen Substanzen gemessen, die aufgrund früherer Arbeiten zur Diskussion stehen.

I. Methode

Zur Messung der Fluoreszenzspektren diente eine Anordnung nach DEHLER und DÖRR (1965). Siehe Abb. 1.

Die beiden Strahlengänge, nämlich der *Erregerstrahlengang* von der Lichtquelle L über den Einfachmonochromator M_1 bis zur Probe in der Küvette K, und der *Meßstrahlengang* von K über den Einfachmonochromator M_2 zum SEV (Sekundärelektronenvervielfacher) und zum Galvanometer G sind gegeneinander geneigt; das hat den Vorteil, daß das von M_1 herrührende, langwellige Streulicht und der Rest des intensiven Erregerlichts nicht in M_2 gelangen. Durch die Beobachtungsanordnung in Durchsicht wirkt ferner die Probe selbst als Streulichtfilter.

Es ist eine Erfahrungstatsache, daß Lage und Struktur des Fluoreszenzspektrums einer Substanz von der Wellenlänge des Erregerlichts unabhängig sind, wenn dieses genügend kurzwellig ist. Man wählt dieses zweckmäßigerweise so, daß eine maximale Fluoreszenzintensität resultiert.

**Apparatur zur Messung von
Fluoreszenzspektren**

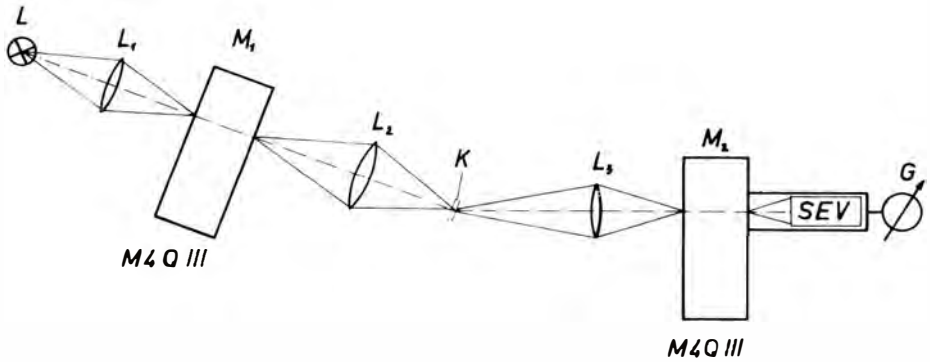


Abb. 1

Zur Aufnahme wurden die Haare eng aneinandergelegt, zwischen zwei Objektträgern eingeklemmt und an der Stelle K in den Strahlengang gebracht, ebenso die wässrigen Extrakte und deren papierchromatographischen Fraktionen in Quarzküvetten.

Als Lösungsmittel waren Aqua dest. und Glycerin geeignet, andere Verbindungen wie Methanol, n-Butanol, Xylol, Aceton, Dioxan, 2-Methyltetrahydrofuran, Methylcyclohexan/Isopentan 2 : 1 besaßen ein zu geringes Lösungsvermögen.

Auf Tieftemperaturspektren, die aufgrund besserer Strukturierung evtl. weitergehende Informationen ergeben hätten, mußten wir verzichten, da sich weder Wasser noch Glycerin glasklar einfrieren lassen.

Die in dieser Arbeit wiedergegebenen Spektren sind nicht auf die spektrale Empfindlichkeit der Meßanordnung korrigiert.

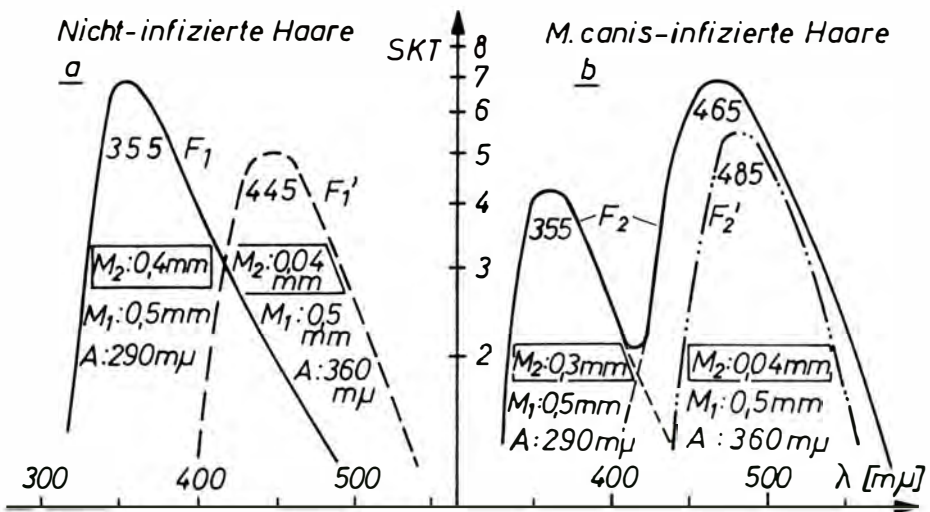


Abb. 2

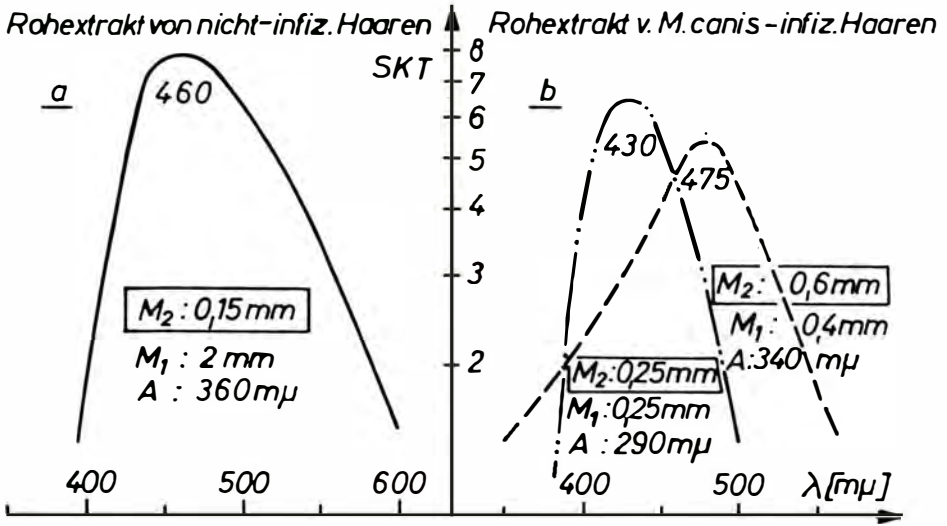


Abb. 3

II. Ergebnisse

In den Abb. 2, 3, 4 a und b sind die Fluoreszenzspektren der infizierten und nicht-infizierten Haare, ihrer wäßrigen Roh- und Reinextrakte dargestellt. Auf die Ordinate sind die im Galvanometer registrierten Skalenteile in logarithmischem Maßstab aufgetragen. Es bedeuten: Die Zahlen M_1 bzw. M_2 die Spaltbreiten der Monochromatoren, die Größe A die Anregungswellenlänge; die Zahlen darüber geben die Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums an.

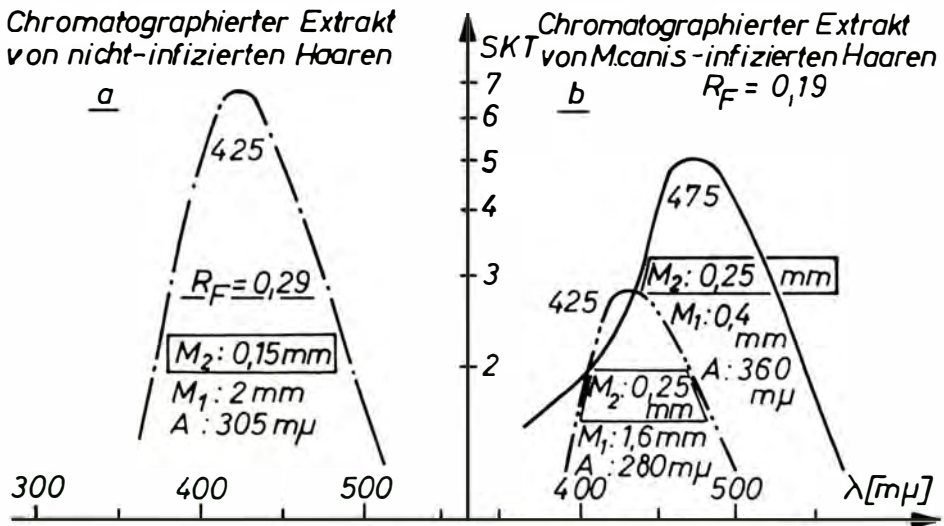


Abb. 4

Tab. Nr. 1: Vergleichssubstanzen, gelöst in Wasser

<i>Substanz</i>	<i>Anregungswellenlänge [mμ]</i>	<i>Fluoreszenzmaximum [mμ]</i>
Biopterin	360	450
Xanthopterin	365	470
Folsäure	360	460
DL-Kynurenin	370	505

Tabelle Nr. 1 enthält die Maxima von Vergleichssubstanzen, **Tab. Nr. 2** die einiger papierchromatographisch erhaltenen Fraktionen nicht-infizierter Haare.

Tab. Nr. 2: Papierchromatographisch gereinigte, wäßrige Fraktionen

<i>R_F-Wert</i>	<i>Anregungswellenlänge [mμ]</i>	<i>Fluoreszenzmaximum [mμ]</i>
0,13	315	425
0,20	305	425
0,32	305	425
0,60	305	425

Zu Tab. Nr. 2:

Die fluoreszierenden Fraktionen nicht-infizierter Haare haben zwar unterschiedliche R_F-Werte, aber alle das Maximum bei etwa 425 m μ . Dies läßt vermuten, daß es sich um ein und denselben fluoreszierenden Stoff handelt, der nur jeweils an verschiedenes Trägerprotein gekoppelt ist und somit unterschiedliche Laufstrecken bei der Papierchromatographie aufweist.

Aus einem Vergleich der Abb. 2, 3, 4 a und b und der Tab. Nr. 2 geht folgendes hervor:

Sowohl infizierte als auch nicht-infizierte Haare samt ihren wäßrigen Extrakten zeigen eine Fluoreszenz!

Bei nicht-infizierten Haaren liegt diese an der Grenze zwischen sichtbarem und UV-Bereich.

Die Spektren der Haare selbst weichen von denen ihrer Roh- und Reinextrakte ab.

Außerdem verändert der Prozeß der Infektion sowohl die Lage als auch die Zahl der Fluoreszenzmaxima.

III. Interpretation

Jeder zu einem Maximum gehörenden Intensitätsverteilung ordnen wir eine definierte Substanz zu. Wegen der fehlenden Feinstruktur sämtlicher Spektren ist jedoch eine Identifizierung dieser Substanzen ohne weitere Hinweise nicht möglich.

Die Fluoreszenzspektren der Haare selbst bewerten wir als die sicherste Information, da die fluoreszierenden Substanzen bei der Herstellung und der Reinigung der Extrakte physikalisch-chemischen Einflüssen (Löslichkeit in Wasser, Zerstörung durch Hitze, Reak-

tion mit dem Chromatographierlösungsmittelgemisch) unterliegen. Trotzdem kommt den Spektren der *wäßrigen* Extrakte Bedeutung zu, da nur sie einen Vergleich mit den Spektren der zur Diskussion stehenden Stoffwechselprodukte des Pilzes im Haar zulassen.

Über den chemischen Prozeß der Infektion lassen sich folgende Aussagen machen:

Fluoreszierende *Ausgangsprodukte* bei nicht-infizierten Haaren sind im wesentlichen die zwei Substanzen, denen die Maxima von 335 $m\mu$ und 445 $m\mu$ entsprechen.

Fluoreszierende *Endprodukte* sind im wesentlichen die drei Substanzen, denen die Maxima 335 $m\mu$, 465 $m\mu$ und 485 $m\mu$ entsprechen.

C. Bioversuch mit Crithidia zum Nachweis unkonjugierter Pteridine

WOLF, JONES und NATHAN berichteten 1958, daß sie aus *Microsporium-Kulturen* auf Haaren eine fluoreszierende Substanz gewannen, die nach ihren Untersuchungen ein unkonjugiertes, trisubstituiertes Pteridin ist.

Um Spuren von Substanzen eines solchen Bautyps nachzuweisen, bedient man sich des Wuchstestes mit *Crithidia fasciculata*, einem Geißeltierchen aus der Trypanosomiden-Verwandtschaft. *Crithidia* benötigt nämlich in der Nährlösung einerseits Folsäure (ein konjugiertes Pteridin), daneben noch einen weiteren Wuchsstoff „*Crithidia-Aktivität*“. Zu diesen Verbindungen gehören z. B. Biopterin und Neopterin, also 2-Amino-4-Hydroxy-Pteridine, die am C_6 mit einer relativ kurzen aliphatischen Seitenkette substituiert sind (Biopterin mit $CHOH \cdot CHOH \cdot CH_3$, Neopterin mit $CHOH \cdot CHOH \cdot CH_2OH$).

Tab. Nr. 3: Trübungsmessung in SKT nach 6 Tagen Wachstum bei Zimmertemperatur

		SKT
Testlösung	ohne Wachstumsfaktor	1,35
„	ohne Wachstumsfaktor nach Beimpfung	1,3
„	+ Biopterin (0,025 mcg/ml)	1,15
„	+ Rohextrakt von <i>nicht-infizierten Haaren</i>	0,81
„	+ chromatographisch gereinigter Extrakt von nicht-infizierten Haaren	0,52
	Fraktion 1 R_f 0,3	
	Fraktion 2 R_f 0,65—0,68	1,15
„	+ Rohextrakt von <i>infizierten Haaren</i>	1,25
„	+ chromatograph. gereinigter Extrakt von infizierten Haaren R_f 0,2	1,3

In der Tab. Nr. 3 fällt sofort die starke *Crithidia-Aktivität* auf, die sowohl der Rohextrakt als auch der chromatographisch gereinigte Extrakt *nicht-infizierter* Haare ausübt.

Das bedeutet, daß im normalen Meerschweinchenhaar entweder ein unkonjugiertes Pteridin analog der Struktur des Biopterin vorliegt, oder größere Mengen an Folsäure, die den gleichen Wachstumseffekt verursachen und „*Crithidia-Aktivität*“ vortäuschen können (NATHAN und COWPERTHWAITTE [1955], ZIEGLER [1965]).

Um dies zu klären, werden wir zusätzliche Bestimmungen der Folsäure-Aktivität mit *Streptococcus faecalis* durchführen müssen. Der R_f -Wert von 0,22—0,35 unserer Fraktion 1 könnte auf Folsäure hindeuten; er könnte aber auch durch die bekannt intensive Adsorption eines unkonjugierten Pteridins an Proteine vreschiedener Größe bedingt sein. (Für letzte Ansicht spricht die Tatsache, daß sämtliche Fraktionen ein identisches Emissionsmaximum bei 425 $m\mu$ aufweisen, also eine einheitliche Substanz darstellen.)

Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, daß unsere Fraktion mit einem R_f -Wert von 0,65—0,68 sicher derjenigen entspricht, die WOLF (1957) mit einem R_f -Wert von 0,67—0,71 aus in-vitro-infizierten Haaren isolierte. Wir können somit einerseits bestätigen, daß diese Substanz mit einem R_f -Wert zwischen 0,65 und 0,71 Crithidia-Aktivität besitzt. Andererseits besagen unsere Versuche aber, daß diese Substanz schon von Natur aus im Haar vorhanden ist und nicht erst durch ein saprophytäres Pilzwachstum gebildet wird.

Ein für uns unerwartetes Bild ergab sich nach Zugabe der Extrakte *infizierter Haare*: Während der Rohextrakt noch eine geringe Vermehrung bewirkte, fehlte beim gereinigten Extrakt (R_f 0,2) die Wuchsstoffwirkung. Das bedeutet, daß der parasitär wachsende Pilz einen Abbau oder eine Veränderung am Molekül dieser Substanz verursacht, wobei zwar ihre Fluoreszenz erhalten bleibt oder sogar zunimmt, ihre Wuchsstoffwirkung aber verloren geht.

Zusammenfassung

Nach in-vivo-Beimpfung von Meerschweinchen-Haaren wurde bei Anregung mit UV-Licht (Woodlicht; 365 m μ) eine visuell beobachtete Fluoreszenz bei den mit *Microsporium canis* beimpften Haaren festgestellt; andere *Microsporium*-Arten waren ungeeignet.

Nach in-vitro-Beimpfung von Haaren mit *M. canis* ließ sich bei gleicher Anregung keine visuell beobachtete Fluoreszenz feststellen.

Fluoreszenzspektroskopische Messungen ergaben: Die durch in-vivo-Infektion mit *M. canis* bei Meerschweinchenhaaren auftretende Fluoreszenz wurde mit der Fluoreszenz nicht-infizierter Haare verglichen: Sowohl nicht-infizierte als auch in-vivo-infizierte Haare zeigen eine Fluoreszenz.

Ein Vergleich zwischen fluoreszierenden Ausgangs- und Endprodukten besagt: Die in-vivo-Infektion von Meerschweinchen mit *M. canis* erzeugt oder vermehrt die Substanz, deren Fluoreszenzmaximum bei 465 m μ liegt, ändert nicht wesentlich die Konzentration der Ausgangssubstanz mit dem Maximum bei 355 m μ . Sie baut die Substanz mit dem Maximum bei 485 m μ auf und die Substanz mit dem Maximum bei 445 m μ ab.

Die fluoreszierenden wäßrigen Rohextrakte und gereinigten Extrakte von normalen, *nicht*-infizierten Haaren zeigten eine Crithidia-Aktivität. Dagegen lassen die fluoreszierenden Stoffe, die durch die in-vivo-Infektion mit *M. canis* an Haaren erzeugt werden, in der verwendeten Konzentration eine Crithidia-Aktivität vermissen.

Summary

After in vivo inoculation of hairs of guinea pigs and exposure to ultraviolet light (Wood's light, 365 m μ) the hairs inoculated with *Microsporium canis* showed fluorescence on visual inspection. Other *Microsporium* species were negative.

After in vitro inoculation of hairs with *M. canis* no visually observable fluorescence was seen in Wood's light.

The fluorescence caused by in vivo infection of hairs of guinea pigs with *M. canis* was compared with the fluorescence of non-infected hairs by means of fluorescence spectroscopy. For non-infected and in vivo infected hairs fluorescence was observed.

A comparison between the initial and terminal fluorescent products showed that in vivo infection of guinea pigs with *M. canis* induces or increases the amount of the substance with a fluorescence maximum at 465 m μ but does not significantly alter the concentration of the substance with a maximum at 355 m μ . The substance with a maximum at 485 m μ is synthesized, the substance with a maximum at 445 m μ is degraded.

The fluorescent aqueous crude extracts and purified extracts of normal, non-infected hairs showed Crithidia activity. The fluorescent substances induced by in vivo infection of hairs with *M. canis* do not possess a Crithidia activity at the concentrations used in these studies.

Literatur

- BEARE, M. and J. WALKER: Non-fluorescent *Microsporum audouini* and *canis* infections of the scalp. *Brit. J. Dermat.* 67, 101—104 (1955).
- BERESTON, E. S. and H. M. CROSSWHITE: Comparative spectroscopy of fluorescent hairs. Studies of *Tr. schönleini*, *M. canis* and *M. audouini*. *A. M. A. Arch. Derm. Syph.* 71, 511—514 (1955).
- CHATTAWAY, F. W. and A. J. E. BARLOW: The fluorescent materials produced in vivo by certain Dermatophytes. *J. gen. Microbiol.*, 11, 506—511 (1954).
- CHATTAWAY, F. W. and A. J. E. BARLOW: Fluorescent substances produced by dermatophytes. *Nature*, London, 181, 281 (1958).
- DALTON, J. E., J. C. SLAUGHTER, R. E. JENKINS, S. PHELPS and V. C. HACHNEY: Microsporiasis due to *Microsporum fulvum*. *J. Invest. Derm.* 15, 421—423 (1950).
- DAVIDSON, A. M. and P. H. GREGORY: Note on an investigation into the fluorescence of hairs infected by certain fungi. *Canad. J. Research* 7, 378—385 (1932).
- DEHLER, J. and F. DÖRR: Apparatur zur Registrierung von Polarisationsgradspektren. *Ztschr. Angew. Physik* 19, 147—152 (1965).
- DÖRR, F.: Analytische Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie. *Ztschr. Analyt. Chemie* 197, 241—254 (1963).
- FELSHER, Z.: Observations on the fluorescent material in hairs infected by *Microsporum in tinea capitis*. *J. Invest. Derm.* 12, 139 (1949).
- KINNEAR, J.: Wood's glass in diagnosis of ringworm. *Brit. Med. J.* 1, 791—793 (1931).
- KLIGMAN, A. M.: The Pathogenesis of *tinea capitis* due to *M. audouini* and *M. canis*. *J. Invest. Derm.* 18, 231—246 (1952).
- KLIGMAN, A. M.: *Tinea capitis* due to *M. audouini* and *M. canis*, *A. M. A. Arch. Derm. Syph.* 71, 313—337 (1955).
- MALLINCKRODT-HAUPT u. C. CARRIÉ: Die Pilzfluoreszenz in vitro. *Arch. f. Dermat.* 169, 519—526 (1934).
- MARGAROT, J. & DEVÈZE, P.: Aspect de quelques dermatoses en lumière ultraviolette. *Bull. Soc. Sci. med. biol. Montpellier*, 6, 375 (1925).
- NATHAN, H. A. and J. COWPERTHWAIT: "Crithidia-Factor" — A new member of the folic acid group of vitamins. *J. Protozool.*, 2/2, 37—42 (1955).
- NATHAN-GUTTMAN, H.: *Crithidia* assays for unconjugated pteridines. Pergamon Press, New York (1962).
- REBELL, G., LAMB, J. H. MAHVI A. and LEE, H. R.: The identification of L-Kynurenine as the cause of fluorescence of the hair of laboratory-rat. *J. of Invest. Derm.* 29, 471—477 (1957).
- ROBINSON, H. M., FIGGE, F. H. J. and BERESTON, E. S.: Fluorescence of *M. audouini*-infected hair. *A. M. A. Arch. Derm. Syph.* 68, 129—135 (1953 a). I. Chemical and spectroscopic studies.
- ROBINSON, H. M., FIGGE, F. H. J. and BERESTON, E. S.: Fluorescence of *M. audouini*-infected hair. II. Cultural Studies. *A. M. A. Arch. Derm. Syph.* 68, 311—313 (1953 b).
- LA TOUCHE, C. J.: Mouse Favus due to *Trichophyton quinckeanum* (ZOFF) MACLEOD and MUENDE: A reappraisal in the light of recent investigations. *Mycopath. appl.* 11, 257—276 (1959).
- VANBREUSEGHEM, R.: Position systématique et nomenclature de l'*Achorion quinckeanum*. *Ann. Parasitol.* 25, 188—199 (1950).
- WILSON, J. W. and PLUNKETT, O. A.: Lack of fluorescence of scalp hairs infected with *Microsporum gypseum* (fulvum). *J. Invest. Derm.* 16, 119—120 (1951).
- WOLF, F. T.: Chemical nature of the fluorescent pigment produced in *Microsporum*-infected hair. *Nature*, London, 180, 860 (1957).
- WOLF, F. T., JONES E. A. and NATHAN, H. A.: Fluorescent pigment of *Microsporum*. *Nature*, London, 182, 475—476 (1958).
- ZIEGLER, I.: Pterine als Wirkstoffe und Pigmente. *Ergebnisse d. Physiologie, Biologie und Exper. Pharmakologie*, 56, 1—66 (1965).

Anschriften der Autoren:

Dr. med. HILDEGARD ZEHETMEIER, 8 München 55, Holzapfelkreuther Str. 12;
 WALTER SCHNEIDER, Dipl.-Physiker, Physiologisches Institut der Universität München;
 Dr. rer. nat. LUISE KREMPL-LAMPRECHT, Hochschuldozentin für Mikrobiologie, Technische Hochschule München