

Diagnostik-Leitfaden „Dermatophyten“ Hunde und Katzen

Anlage zur ESCCAP-Empfehlung „Dermatophytosen“



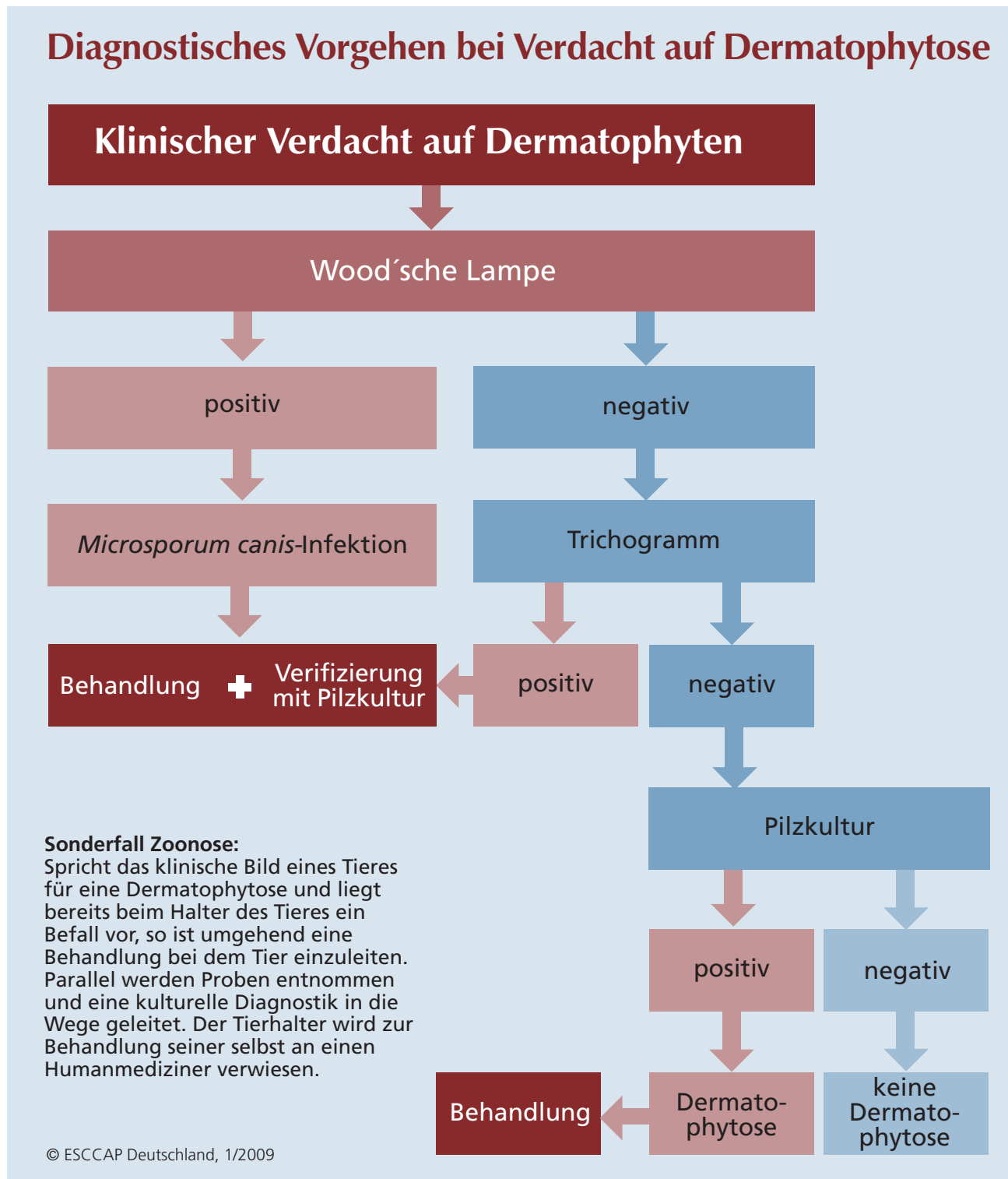
Diagnostik-Leitfaden „Dermatophyten“ bei Hunden und Katzen

Anlage zur ESCCAP-Empfehlung „Dermatophytosen“
Februar 2009

Inhalt

1. Flowchart Diagnosefindung bei Verdacht auf Dermatophytose	3
2. Durchführung der Untersuchung mit einer Wood'schen Lampe auf Dermatophytose	4
3. Durchführung eines Trichogramms	4
4. Pilzkultur – Probenentnahme	4
5. Pilzkultur – Durchführung und Bewertung	5
5.1 Direktpräparat	5
5.2 Medien für die Pilzkultur	5
5.3 Kulturelle Untersuchung	6
5.4 Mikroskopische Beurteilung	7

1. Flowchart Diagnosefindung bei Verdacht auf Dermatophytose



2. Durchführung der Untersuchung mit einer Wood'schen Lampe auf Dermatophytose

- Aufwärmen der Wood'schen Lampe für 5 Minuten
- Abdunkeln des Untersuchungsraums
- Sorgfältiges Beleuchten der gesamten Hautoberfläche des Patienten
- Bewerten der Fluoreszenz

Cave: Kosmetika, Seifen, Shampoos, Bakterien etc. können zu einer positiven Fluoreszenz von einzelnen Schuppen oder kleineren Arealen führen, nur eine grünliche Fluoreszenz von Haarschäften ist diagnostisch für *Microsporum canis*, allerdings wird eine solche Fluoreszenz nicht bei allen *M. canis*-Stämmen gesehen, daher ist nur ein positives Ergebnis aussagekräftig!

3. Durchführung eines Trichogramms

- Haare werden mit einer Klemme ausgezupft, deren Schenkel mit Gummi umwickelt sind (Abb. 1). Besonders geeignet sind Grenzbereiche alopezischer Areale sowie Stellen, die im Moment Haare verlieren.
- Diese Haare werden auf einen Objektträger verbracht. Ein Tropfen Mineralöl auf der Oberfläche des Objektträgers erleichtert die Untersuchung und fixiert die Haare (Abb. 2).
- Ein Deckglas wird auf die im Mineralöl liegenden Haare gelegt.
- Die Probe wird mikroskopisch unter 40- bis 100-facher Vergrößerung bewertet. Sporen und Hyphen auf dem Haarschaft erschweren die Unterscheidung von Kutikel, Mark und Rinde von Primärhaaren, die bei nicht befallenen Haaren sehr deutlich ist (Abb.3).

Cave: Ausmaß der Probenentnahme und Erfahrung des Untersuchenden beeinflussen die Wahrscheinlichkeit einer Diagnose. Negative Trichogramme von einem Patienten mit Dermatophytose sind auch bei optimaler Probenentnahme und Bewertung möglich, daher ist nur ein positives Ergebnis aussagekräftig!



Abbildung 1



Abbildung 2



Abbildung 3

4. Pilzkultur – Probenentnahme

- Haare, Schuppen und Krusten aus dem Randbezirk von Hautläsionen werden mit einem Skalpell oder einer Klemme entfernt (Abb. 1) und in ein Probengefäß zum Transport mykologischer Proben oder auf einen Agar direkt verbracht.
- Zusätzlich wird mit einer neu gekauften und damit sterilen Zahnbürste das gesamte Fell des betroffenen Tieres sorgfältig durchgebürstet (Abb. 4). Dabei wird die klinisch nicht betroffene Haut zuerst beprobt, danach die Hautläsionen. Danach wird die Zahnbürste entweder in einem Briefumschlag eingeschickt oder die zwischen den Borsten befindlichen Haare und Schuppen auf den Agar verbracht.
- Je mehr Haare, Schuppen und/oder Krusten verwendet werden, umso geringer ist die Wahrscheinlichkeit einer falsch-negativen Pilzkultur.



Abbildung 4

5. Pilzkultur – Durchführung und Bewertung

5.1 Direktpräparat

Neben der Kultur sollte sinnvollerweise, besonders bei Tieren mit Verdacht auf eine massive Infektion, eine direkte Untersuchung durchgeführt werden. Diese kann entweder nativ nach Einwirken einer Kalium- oder Natronlauge oder unter Zuhilfenahme eines Aufhellers (Blankophors) erfolgen. Es werden einige Haare in eine NaOH/DMSO-Lösung mit dem Blankophor verbracht und etwa 30 Minuten dort belassen. Anschließend wird das Material unter UV-Licht mikroskopiert. Liegt eine Infektion vor, leuchten vorhandene Pilzelemente, unabhängig von der Spezies, blau-grünlich (Abb. 5) und geben einen schnellen weiteren Hinweis für eine Therapie.

Cave: Im negativen Fall ist eine Dermatophytenose nicht ausgeschlossen. Eine Kultur sollte in jedem Fall angelegt werden.

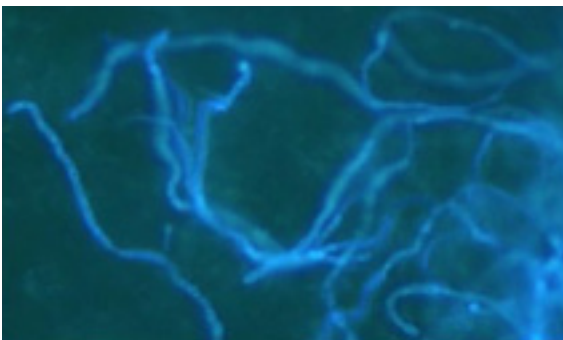


Abbildung 5: Hyphen von Dermatophyten nach Einwirken eines Blankophors unter UV-Licht.

Bei der Kultivierung von Patientenproben auf das Vorhandensein von Dermatophyten sind zu beachten: die Selektivität des Mediums, die Inkubationstemperatur und die Inkubationsdauer.

5.2 Medien für die Pilzkultur

Als Medien können nicht-selektive Agars oder Selektivmedien für Dermatophyten Verwendung finden. Üblicherweise werden vor allem Petrischalen mit Agar verwendet, aber auch der Einsatz der Medien als Schrägagar im Reagenzglas kann zur Verhinderung der Austrocknung des Agars bei einer erwarteten längeren Bebrütungszeit sinnvoll sein (Abb. 6). Ziel der Auswahl ist in jedem Fall die Unterdrückung eines Wachstums von Bakterien, Hefen und vor allem von kontaminierenden Schimmelpilzen.



Abbildung 6: Medien für die kulturelle Anzucht von Dermatophyten im unbeimpften Zustand

Beispiele für nicht-selektive Medien sind Sabouraud-Agar mit 2 % Glucose, Sabouraud-Agar mit Zusatz von Schafblut oder Kimmig-Agar. Selektivmedien für Dermatophyten werden von verschiedenen Firmen vertrieben; Beispiel sind Taplin-Agar, Dermatophyten Test Medium oder Mycosel-Agar. Prinzip dieser Medien sind der Zusatz von Cycloheximid (Actidion) zur Hemmung von Schimmelpilzen und der Zusatz von Phenolrot als Indikator für ein Dermatophytenwachstum (Umschlag in den alkalischen Bereich, Rotfärbung).

Cave: Zu betonen ist jedoch, dass sowohl ein Wachstum als auch ein Farbumschlag nicht nur von Dermatophyten, sondern auch von einigen Schimmelpilzen (z.B. *Scopulariopsis*-, *Chrysosporium*-Arten, „Schwärzepilze“) erreicht werden kann (Abb. 7).

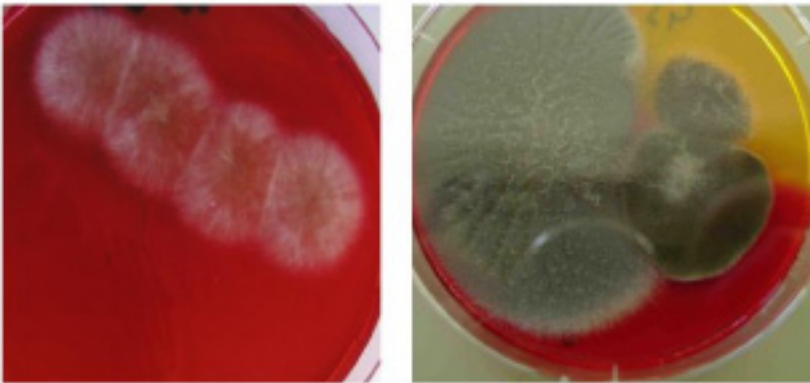


Abbildung 7: Wachstum von Dermatophyten (links) und Schimmelpilzen (rechts) auf einem Dermatophyten-Selektivmedium.

5.3 Kulturelle Untersuchung

Nach Eingang der Proben werden lose Haare und Geschabsel in eine sterile Petrischale verbracht. Zahnbürsten werden dreimal in den Agar abgedrückt, um anhaftende Pilbestandteile in den Agar zu verbringen. Haare aus einer Zahnbürste werden mit einer sterilen Pinzette gründlich herausgezogen und ebenso wie das lose Material auf die Agars verbracht und angedrückt (Abb. 8). Ein guter Kontakt der Probe und damit der Pilzhyphen und/oder Sporen zum Nährboden ist von Bedeutung für eine sichere Diagnostik. Sind zu viele Haare vorhanden, können diese anschließend auch wieder von der Platte entfernt werden. Zu beachten ist, dass Anteile der verschiedenen Bereiche einer Probe (und damit des Tieres), falls vorhanden, gleichmäßig auf alle Agars verteilt werden. Sinnvoll ist das Auslassen des Randbereichs einer Platte, um im Labor anfliegende Schimmelpilze als Kontaminanten zu erkennen.



Abbildung 8: Anlegen einer Pilzkultur.

Die Bebrütung erfolgt bei 25 bis 32 °C. Im Veterinärbereich ist häufig eine höhere Temperatur sinnvoller, da gelegentlich eine recht hohe Belastung mit Schimmelpilzen vorliegt, die bei einer höheren Temperatur eher im Wachstum verzögert werden.

Die Kulturen sollten die ersten Tage täglich kontrolliert werden, um ein Schimmelpilzwachstum (Abb. 7 und 9) zu erkennen. In diesem Fall muss eine Bebrütung aufgrund des raschen und umfangreichen Wachstums dieser Pilze häufig abgebrochen und eine neue Probe angefordert werden.

Als Faustregel für die Unterscheidung von Schimmelpilzen und Dermatophyten kann das häufig (aber nicht immer) farbige Wachstum der Schimmelpilze an der Luftseite der Kultur (grün-braun-grau-schwarz) und der Dermatophyten an der Agarseite (braun-gelb) gelten. Anschließend werden die Kulturen alle zwei Tage auf das Wachstum von „schneesternartigen“ Kolonien kontrolliert (Abb. 7 und 9). Neben dem Aussehen kann auch der Geruch der Kulturen einen Hinweis auf die vorliegende Spezies und damit die Pathogenität geben (z.B. lauchartiger Geruch bei *Trichophyton terrestre*).

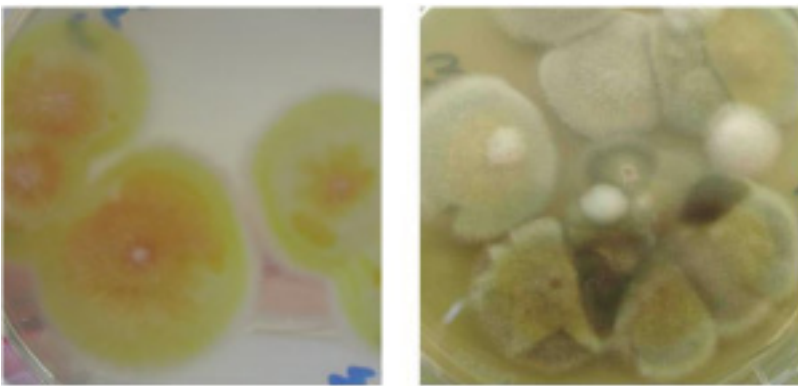


Abbildung 9: Wachstum von Dermatophyten (links) und Schimmelpilzen (rechts) auf Sabouraud-Agar.

5.4 Mikroskopische Beurteilung

Nach etwa 3-10 Tagen kann ein mikroskopisches Präparat der Pilze angefertigt werden. Im frühen Wachstumsstadium werden häufig nur Hyphen zu mikroskopieren sein, die keinen Aufschluss über das vorhandene Genus bzw. die Spezies geben. Präparate werden üblicherweise mit einer Alkohol/Wasser-Lösung oder mit dem Farbstoff Laktophenolblau angefertigt. Zum Verbringen der Pilzbestandteile auf den Objektträger kommen entweder „Präparierhaken“ oder Tesafilm zum Einsatz. Häufig müssen Präparate von verschiedenen Bereichen der Kolonien und zu unterschiedlichen Zeitpunkten angefertigt werden, um für eine Identifizierung geeignete Formen der Pilze zu erhalten. Es ist zu erwarten, dass an „wattigen, wolligen“ Bereichen eher Hyphen und an „puderigen, gipsartigen“ Bereichen eher Sporen vorliegen. Die Mikroskopie erfolgt zunächst bei 100-facher und anschließend gegebenenfalls bei 400-facher Vergrößerung.

Zur Beurteilung der mikroskopischen Präparate werden vor allem herangezogen: Breite und Septierung der Hyphen, Einheitlichkeit des Myzels, Bildung von Spiralhyphen, Racket-Myzel und/oder Chlamydosporen, Bildung von Konidiosporen (Konidien). Bei Dermatophyten können zwei Formen von Konidien gebildet werden: Makrokonidien und Mikrokonidien. Grundsätzlich wird von den beiden in Frage kommenden Genera *Microsporum* und *Trichophyton* das Genus *Microsporum* eher Makrokonidien, das Genus *Trichophyton* eher Mikrokonidien ausbilden (Abb. 10). Für eine genauere Beurteilung können die Form und Struktur der Konidien sowie die Art der Bildung der Konidien an den Hyphen herangezogen werden.

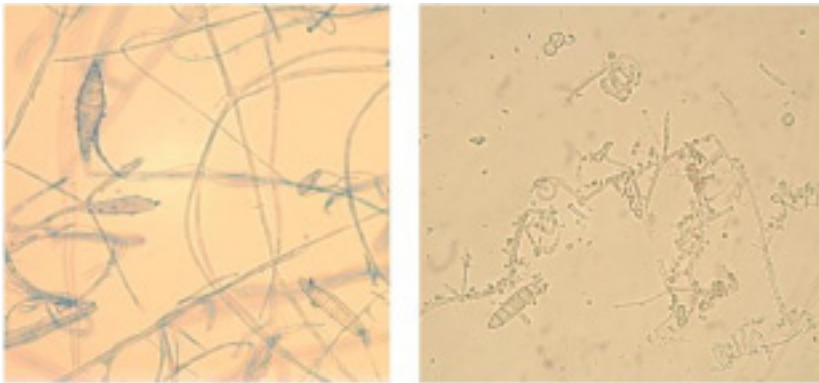


Abbildung 10: Mikroskopisches Bild von Microsporum canis (links) und Trichophyton mentagrophytes (rechts).

Bei gut an eine Wirtstierart adaptierten Dermatophyten ist es möglich, dass lediglich Hyphen ausgebildet werden. In diesen Fällen kann versucht werden, durch eine Subkultivierung auf einem Mangelmedium, manchmal aber auch durch Verwendung eines Agars mit Blutzusatz, die Bildung von Konidien zu forcieren. Dies wird nicht in jedem Fall gelingen, so dass eine genaue Bestimmung des Pilzes nicht immer möglich sein wird.

ESCCAP Deutschland dankt folgenden Personen für die Unterstützung bei der Erstellung dieses Diagnostik-Leitfadens „Dermatophyten“:

- Dr. Christiane Werckenthin
 Fachtierärztin für Mikrobiologie
 Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie
 Veterinärwissenschaftliches Department
 Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Prof. Dr. Ralf S. Müller
 Diplomate, European & American College of Veterinary Dermatology
 Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
 Tierklinisches Department
 Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
 Leiter des Lehrstuhls für Bakteriologie und Mykologie
 Veterinärwissenschaftliches Department
 Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München

ESCCAP



EUROPEAN SCIENTIFIC COUNSEL COMPANION ANIMAL PARASITES

Diagnostik-Leitfaden „Dermatophyten“ Hunde und Katzen

Anlage zur ESCCAP-Empfehlung „Dermatophytosen“

Herausgeber:

ESCCAP Deutschland
c/o Pressebüro Vennebusch
Overbeckstraße 4, 49080 Osnabrück
Tel.: 0541 / 20 27 384
Fax: 0541 / 20 27 385
E-Mail: info@esccap.de
Internet: www.esccap.de

In Zusammenarbeit mit:

Bundestierärztekammer e.V. (BTK)
Bundesverband Praktizierender Tierärzte e.V. (bpt)
Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG)
Deutsche Gesellschaft für Kleintiermedizin der DVG (DGK-DVG)



Die Arbeit von ESCCAP wird durch Sponsoren ermöglicht. Unser Dank gilt:



Bayer HealthCare
Tiergesundheit



NOVARTIS
ANIMAL HEALTH

Die Umsetzung der ESCCAP-Aktivitäten „Dermatophyten“ in Deutschland wird zusätzlich unterstützt durch:



Stand Februar 2009