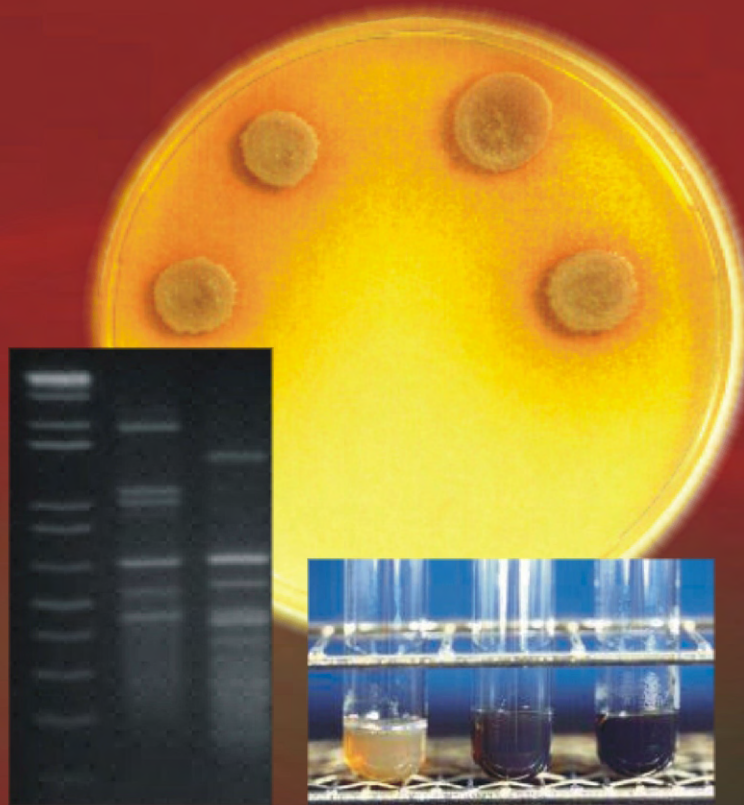


**PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHE UND  
GENETISCHE CHARAKTERISIERUNG  
DER SPEZIES *Malassezia pachydermatis*  
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG  
EINER PIGMENTBILDENDEN SUBGRUPPE**

**VOLKER FRIEDRICH WILHELM LANDGRAF**



**INAUGURALDISSERTATION**

Zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Physiologisch-biochemische und genetische Charakterisierung  
der Spezies *Malassezia pachydermatis* unter besonderer  
Berücksichtigung einer pigmentbildenden Subgruppe**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Volker Friedrich Wilhelm Landgraf**

aus Frankfurt am Main

Gießen 2006

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie  
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. P. Mayser  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Mayser  
Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Sziegoleit

Tag der Disputation: 12.02.2007

## Liste der verwendeten Abkürzungen

ASC	animal dermatology center, Nihon, Japan
ATCC	american type culture collection, Maryland, USA
bp	Basenpaare
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>M.</i>	<i>Malassezia</i>
<i>P.</i>	<i>Pityrosporum</i>
P-Agar	Pigmentbildung induzierender Agar
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
Rf	Retentionsfaktor
S <sub>AB</sub>	Dice-Koeffizienten
SPF	Selektivagar für pathogene Pilze
spp.	Spezies
TRP	Tryptophan
UV	ultraviolett

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Hintergrund und Fragestellung</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Das Genus <i>Malassezia</i> („<i>Pityrosporum</i>“) im historischen Überblick</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Merkmale des Genus <i>Malassezia</i> – insbesondere der Spezies <i>M. pachydermatis</i></b>	<b>11</b>
1.3.1 Morphologie der <i>Malassezia</i> spp.	11
1.3.2 Morphologie der Spezies <i>M. pachydermatis</i>	12
1.3.3 Physiologie und Biochemie der <i>Malassezia</i> spp.	12
1.3.4 Bisherige physiologisch-biochemische Untersuchungen der Spezies <i>M. pachydermatis</i>	13
1.3.5 Bisherige genetische Untersuchungen der Spezies <i>M. pachydermatis</i>	14
<b>1.4 Epidemiologie und Krankheitsbilder</b>	<b>15</b>
1.4.1 Epidemiologie und <i>Malassezia</i> spp. assoziierte Erkrankungen	15
1.4.2 Epidemiologie und <i>M. pachydermatis</i> assoziierte Erkrankungen	17
1.4.3 Therapie von <i>M. pachydermatis</i> assoziierten Erkrankungen	18
1.4.4 Pathogenese von <i>M. pachydermatis</i> assoziierten Erkrankungen	19
<b>1.5 Fragestellung</b>	<b>20</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Herkunft der verwendeten 210 Stämme</b>	<b>22</b>
2.1.1 Referenzstämme	22
2.1.2 Stämme von Dres. Aizawa und Kano (Japan)	22
2.1.3 Einheimische Wildstämme	23
<b>2.2 Inkubation und Kulturverfahren</b>	<b>24</b>
2.2.1 Modifizierter Dixon-Agar	24
2.2.2 Selektivagar für pathogene Pilze	25
<b>2.3 Untersuchungsmethoden</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1 Physiologisch-biochemische Untersuchungsmethoden</b>	<b>25</b>
2.3.1.1 Bestimmung der Keimzahl	25
2.3.1.2 Prüfen der Konsistenz	27
2.3.1.3 Spaltung von Eskulin	27
2.3.1.4 Catalase-Aktivität	27

2.3.1.5 Kohlenhydratauxanogramm	27
2.3.1.5.1 <i>Substrate</i>	28
2.3.1.5.2 <i>Medium</i>	28
2.3.1.5.3 <i>Herstellung</i>	29
2.3.1.5.4 <i>Herstellung der sterilen Filterpapierstücke</i>	29
2.3.1.6 Lipidauxanogramm	29
2.3.1.6.1 <i>Herstellung</i>	30
2.3.1.7 Pigmentierungstests	30
2.3.1.7.1 <i>Durchführung</i>	32
2.3.1.8 Auswertung der physiologisch-biochemischen Ergebnisse mittels Zahlencode	32
<b>2.3.2 Genetische Untersuchungen durch RAPD</b>	<b>32</b>
2.3.2.1 Extraktion von DNA	33
2.3.2.2 RAPD	34
2.3.2.2.1 <i>Primer</i>	35
2.3.2.3 Gelelektrophorese	35
2.3.2.3.1 <i>Vorbereitung</i>	35
2.3.2.3.2 <i>Durchführung</i>	36
2.3.2.3.3 <i>Materialien</i>	36
2.3.2.4 Datenanalyse der RAPD-Ergebnisse	37
<b>2.4 Analyse des Pigments von <i>M. pachydermatis</i></b>	<b>38</b>
2.4.1 Gewinnung des Pigments als Rohextrakt	38
2.4.2 Säulenchromatographie	39
2.4.3 Dünnschichtchromatographie	40
<b>2.5 Statistische Methoden</b>	<b>40</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>3.1 Physiologisch-biochemische Untersuchungsmethoden</b>	<b>42</b>
3.1.1 Bestimmung der Keimzahl	42
3.1.2 Prüfen der Konsistenz	42
3.1.3 Spaltung von Eskulin	42
3.1.4 Catalase-Aktivität	43
3.1.5 Kohlenhydratauxanogramm	43
3.1.6 Lipidauxanogramm	45
3.1.7 Pigmentierungstests	47

<b>3.2 Zusammenfassung der physiologisch-biochemischen Ergebnisse</b>	<b>50</b>
<b>3.3 Ergebnisse der RAPD-Untersuchungen</b>	<b>51</b>
<b>3.4 Gegenüberstellung der physiologisch-biochemischen und genetischen Typen</b>	<b>54</b>
<b>3.5 Analyse des Pigments</b>	<b>55</b>
<b>3.6 Statistische Voraussage von Pigmentbildung</b>	<b>56</b>
<b>4 Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
<b>6 Summary</b>	<b>71</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>87</b>
<b>9 Erklärung zur selbstständigen Anfertigung der Dissertation</b>	<b>116</b>
<b>10 Lebenslauf</b>	<b>117</b>
<b>11 Danksagung</b>	<b>118</b>



## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> CBS-Referenzstämme	22
<b>Tabelle 2:</b> ASC-Stämme	23
<b>Tabelle 3:</b> Herkunft der einheimischen Wildstämme	23
<b>Tabelle 4:</b> Zusammensetzung des m-Dixon-Agars	24
<b>Tabelle 5:</b> Nitrogenbasis-Stammlösung nach Herstellerangaben	28
<b>Tabelle 6:</b> Bezeichnung der Tween <sup>®</sup> - Ester	29
<b>Tabelle 7:</b> P-Agar	31
<b>Tabelle 8:</b> Einstellung des Linomaten	40
<b>Tabelle 9:</b> Assimilationsprofile beim Kohlenhydratauxanogramm	43
<b>Tabelle 10:</b> Metabolisierung der einzelnen Substrate beim Kohlenhydratauxanogramm	44
<b>Tabelle 11:</b> Gegenüberstellung der physiologisch-biochemischen und genetischen Typen	54
<b>Tabelle 12:</b> Kohlenhydrat- und Tween-Assimilationsergebnisse in der Literatur	59
<b>Tabelle 13:</b> Physiologisch-biochemische Profile	87
<b>Tabelle 14:</b> Farbbanden und Fluorochrome des starken Pigmentbildners	95
<b>Tabelle 15:</b> Farbbanden und Fluorochrome des schwachen Pigmentbildners	102
<b>Abbildung 1:</b> Das häufigste Assimilationsprofil beim Kohlenhydratauxanogramm	44
<b>Abbildung 2:</b> Tween- und Cremophor-Hydrolyse	46
<b>Abbildung 3:</b> Pigmentsynthese auf P-Agar	48
<b>Abbildung 4:</b> Bildung eines weißen Ringes auf P-Agar	48
<b>Abbildung 5:</b> Entfärbter Hof im Agar und weiße Ringbildung auf P-Agar ohne Glukose	50
<b>Abbildung 6:</b> Dendrogramm zur Clusteranalyse	53
<b>Abbildung 7:</b> Dünnschichtchromatographien	56
<b>Abbildung 8:</b> RAPD Profile eines Pigmentbildners und eines Nicht-Pigmentbildners	57
<b>Abbildung 9:</b> Physiologisch-biochemische Parameter in statistischen Modellen	107
<b>Abbildung 10:</b> Genetische Parameter in statistischen Modellen	110

# 1 Hintergrund und Fragestellung

## 1.1 Einleitung

Hefen der Gattung *Malassezia* - auch bekannt unter der älteren Bezeichnung *Pityrosporum* - werden insbesondere im Zusammenhang mit dem klinischen Krankheitsbild der Pityriasis versicolor hervorgehoben (Kennzeichen: Hyper- und hypopigmentierende, milchkaffeefarbene und schuppige Hautläsionen); sie gelten als auslösende Erreger (Hay 1998, Gupta 2002).

*Malassezia*- bzw. *Pityrosporum*-Hefen sind seit mehr als einhundert Jahren als Bestandteile der residenten Mikroflora der menschlichen Haut und der Haut vieler Warmblüter bekannt (Yarrow 1984, Ingham 1993) und treten vorwiegend in seborrhoischen Regionen auf (Midgley 2000).

Sie gehören zu den wenigen obligat lipidabhängigen Mikroorganismen (Guého 1996). In ihrem Genus befindet sich als einzige Ausnahme die lipophile, aber nicht lipiddependente Spezies *Malassezia pachydermatis* (Synonyme: *Pityrosporum pachydermatis*, *Pityrosporum canis*). Letztere tritt vornehmlich bei Tieren auf und verursacht hier Krankheitsbilder, insbesondere Otitiden (Crespo 2002) und verschiedene Hauterkrankungen (Bond und Lloyd 1998).

In der Vergangenheit wurde versucht, sowohl die Gattung *Malassezia* als auch die Spezies *Malassezia pachydermatis* auf der Grundlage morphologischer sowie physiologisch-biochemischer Charakteristika zu differenzieren (Slooff 1970, Sanguinetti 1984, Kiss 1996, Guého 1996). Die damit verbundene hohe Subjektivität und oft fehlende Reproduzierbarkeit durch instabile Eigenschaften hofft man durch kürzlich in den Vordergrund getretene molekularbiologische Techniken zu entkräften. Das Ziel ist eine einfache und zuverlässige Routinediagnostik (Guillot 1999).

In den letzten Jahren konnten regelmäßig neue Spezies auf genetischer Grundlage definiert werden, zuletzt *Malassezia yamatoensis* (Sugita 2004) und *Malassezia nana* (Hirai 2004). Heute sind elf *Malassezia*-Spezies bekannt (Giusiano 2006).

Auch innerhalb der Spezies *M. pachydermatis* konnte sowohl morphologisch bzw. physiologisch-biochemisch (Kiss 1996) als auch genetisch (Guillot 1997, Chryssanthou 2001, Aizawa 2001) eine Heterogenität unterschiedlicher Ausprägung demonstriert werden. Aizawa

und Kano wendeten 2001 die RAPD-Methode (random amplified polymorphic DNA) an und beschrieben zudem als Ergebnis der Sequenzierung des Chitin Synthase 2 Gens (Kano 1999) eine besondere phylogenetische Nähe eines Teils der untersuchten *M. pachydermatis*-Isolate (12%) zur Spezies *M. furfur*.

In diesem Zusammenhang ist die gemeinsame Besonderheit einer Tryptophan-abhängigen Synthese von Pigmenten und Fluorochromen bei *M. furfur*-Isolaten im Allgemeinen und einem Teil von *M. pachydermatis*-Isolaten auffällig (ca. 11%, Mayser 2004). Einige Bestandteile dieser Stoffwechselwege konnten bei *M. furfur* identifiziert werden (Wille 2001; Mayser 2002, 2003; Irlinger 2004, 2005). Sie kommen als Pathogenitätsfaktoren bei *Malassezia* assoziierten Erkrankungen in Frage (Krämer und Podobinska 2005, Krämer und Kessler 2005). Bei *M. pachydermatis* indes wurde bisher nur der UV-Filter Pityriacitrin als Pigmentbestandteil nachgewiesen (Mayser 2004).

Weder physiologisch-biochemisch noch genetisch ist die pigmentbildende *M. pachydermatis*-Subgruppe bisher untersucht worden.

Wegen der möglichen Pathogenität ihrer Pigmentbestandteile wäre insbesondere ein charakteristisches genetisches Profil von Pigmentbildnern interessant, mit dem Ziel sie schnell und zuverlässig zu identifizieren. Bisher werden *M. pachydermatis*-Pigmentbildner kulturell nach zwei bis drei Wochen nachgewiesen (Mayser 2004). Hierbei kommt die RAPD-Methode in Betracht. Sie deckt DNA-Polymorphismen auf und ist eine geeignete Methode, um feine genetische Unterschiede in Isolaten zu erkennen (Bartish 1999, Trevino-Castellano 2003).

## **1.2 Das Genus *Malassezia* („*Pityrosporum*“) im historischen Überblick**

Im Jahr 1846 fand Eichstedt unter dem Mikroskop in Schuppenmaterial von Pityriasis versicolor-Erkrankungen (erstmal 1801 durch Willan beschrieben) reichlich Pilzfäden, woraufhin er auf eine Pilzerkrankung schloss. 1853 benannte Robin den Pilz der Pityriasis versicolor als erster *Microsporon furfur*. Aufgrund mikromorphologischer Eigenschaften verneinte Baillon 1889 seine Zugehörigkeit zur Gattung *Microsporon* und gab ihm im Rahmen einer neuen Gattung den Namen *Malassezia (M.) furfur* – zu Ehren des Pariser Pathologen Malassez.

Der Name *Pityrosporum* („Spore der Schuppe“) wurde 1904 von Sabouraud in Bezug auf Kopfschuppen geprägt. Aufgrund der ovalen Zellform führte Castellani 1913 die Bezeichnung *Pityrosporum (P.) ovale* ein. 1951 isolierte Gordon eine Hefe sowohl von normaler Haut als auch aus Läsionen der Pityriasis versicolor. Gordon vermutete, dass es sich nicht um *M. furfur* handle, da der Pilz keine Hyphen produzierte und auch keine Pityriasis auslösen konnte. Aufgrund der runden Zellform gab er ihm den Namen *Pityrosporum (P.) orbiculare*. In der Folge konnten Übergänge zwischen ovalen und runden Zellformen beobachtet werden (Gordon 1951, Slooff 1970).

1977 zeigte Dorn, dass *P. orbiculare* auch in vitro auf Glycin-haltigem Medium Hyphen produzieren kann, die denen der Pityriasis versicolor entsprachen. Eine Hyphenbildung wurde im gleichen Jahr von Nazzarro auch bei ovalen Formen induziert. Andere Forscher konnten diese Ergebnisse bestätigen (Civita 1978, Maheswari 1982). Künftig wurde nicht nur die Identität von *P. orbiculare*, *P. ovale* und *M. furfur*, sondern grundlegend die schon von Acton 1928 propagierte Identität der Gattungen *Pityrosporum* und *Malassezia* anerkannt. 1986 würdigte die Internationale Kommission zur Taxonomie der Pilze die historische Priorität der Bezeichnung *Malassezia* (Cannon 1986).

Bereits 1925 hatte Weidman von der entzündeten Haut eines indischen Rhinozeroses (*Rhinoceros unicornis*) ein Isolat erhalten. Aufgrund der Ähnlichkeit mit *P. ovale* ordnete er es der Gattung *Pityrosporum* zu und beschrieb es als *Pityrosporum (P.) pachydermatis*, auch wenn es - da nicht obligat lipiddependent - eine Sonderstellung im Genus innehatte. Die von Gustafson 1955 aus Hundeotitiden isolierte Hefe flaschenförmiger Zellen, von ihm *Pityrosporum canis* genannt, konnte von Frazer 1961 als identisch mit *P. pachydermatis* nachgewiesen werden. Im Übrigen stammt der noch heute gültige Referenzstamm der Spezies *Malassezia pachydermatis* CBS 1879 aus Gustafsons Bestand. 1970 ordnete Slooff alle *Pityrosporum*-Isolate, die auf Medien ohne Lipidzugabe wuchsen, der Spezies *P. pachydermatis* zu. Yarrow und Ahearn änderten 1984 die Bezeichnung in *Malassezia pachydermatis* um. Diesen Vorschlag zur Namensgebung hatte Dodge bereits 1935 gemacht. Guillot, Guého und Chermette bestätigten 1995 molekularbiologisch die taxonomische Einheit von *M. pachydermatis*, wiesen jedoch auf Heterogenität innerhalb der Spezies hin.

Neben den beiden Spezies *M. furfur* und *M. pachydermatis* konnte 1990 eine weitere Spezies der Gattung *Malassezia (M. sympodialis)* von Simmons beschrieben werden. Molekulargenetischen Untersuchungen zufolge konnten zusätzlich die vier Spezies *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* und *M. slooffiae* abgegrenzt werden (Guého 1996, Guillot

1996). Ebenfalls durch genetische Tests sind in den folgenden Jahren regelmäßig neue Spezies nachgewiesen worden, zuletzt *Malassezia dermatis*, *Malassezia japonica* und *Malassezia yamatoensis* (Sugita 2002, 2002, 2004) und bei Tieren *Malassezia nana* (Hirai 2004). Allgemein anerkannt sind diese jedoch noch nicht, da bestätigende physiologisch-biochemische Studien bislang fehlen.

Als Referenzstämme für *M. pachydermatis* gelten CBS 1879 (ATCC 14522) (type culture von *P. canis* und neotype culture von *M. pachydermatis* aus dem Ohr eines Hundes mit Otitis) und CBS 1892 (aus dem Ohr eines gesunden Hundes).

### **1.3 Merkmale des Genus *Malassezia* – insbesondere der Spezies *M. pachydermatis***

#### **1.3.1 Morphologie der *Malassezia* spp.**

In vitro können *Malassezia*-Hefen aus Schuppenmaterial oder Abstrichen angezüchtet werden; wegen ihrer obligaten Lipiddependenz ist die Verwendung eines lipidhaltigen Mediums erforderlich (*M. pachydermatitis* bildet die einzige Ausnahme). Auf lipidhaltigem Dixon-Agar bilden sich cremefarben-gelbliche Kolonien mit fruchtig-hefigem Geruch aus (van Abbe 1964, Labows 1975). Bei manchen Autoren wird die Oberflächenstruktur der Kolonien als charakteristisch für die einzelne Spezies angegeben (van Abbe 1964, Guého 1996).

Die Vermehrung von *Malassezia*-Hefen erfolgt durch monopolare oder sympodiale Sprossung unter Ausbildung einer Collarette (Narbe an Mutterzelle); eine sexuelle Vermehrung wurde nicht beobachtet (Slooff 1970; Simmons 1987, 1990). Die Sprosszellen sind rund (2,5-5 µm im Durchmesser), oval oder zylindrisch (1,5-3,0 x 2,5-8,0 µm). Hyphenbildung kann in der Kultur einiger Spezies beobachtet werden (Guého 1996).

Die Zellhülle von *Malassezia* spp. zeigt einen einzigartigen Aufbau (Simmons 1987, Mittag 1995). *Malassezia*-Hefen besitzen eine 0,12 µm dicke, mehrschichtige Zellhülle mit spiraligem Aufbau bestehend aus einer Außenlamelle, einer mehrschichtigen Wand und der Plasmamembran (Slooff 1970, Winiarczyk 1992, Guillot und Prevost 1995). Charakteristisch ist ein zur Oberfläche vertikales Streifenmuster in den inneren Wandabschnitten: eine spiralige Struktur, die lichtmikroskopisch erkennbar ist (Slooff 1970). Die einzelnen Komponenten der Zellwand konnten bezüglich ihrer Funktion noch nicht vollständig erklärt werden (Mayser 1998).

Der Aufbau der gesamten Zellhülle von *Malassezia* spp. mit einem hohen Lipidanteil von 15% (Thompson 1970) ist vermutlich der Grund für die hohe Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen, z.B. für die hohe mechanische Stabilität und Osmoresistenz (Brotherton 1967).

*Malassezia*-Hefen werden u.a. aufgrund der mehrschichtigen Struktur ihrer Zellwand in Verwandtschaft zu den Basidiomyceten gesehen (Guého 1996).

### 1.3.2 Morphologie der Spezies *M. pachydermatis*

Slooff unterschied 1970 einen kleinen (2,5-4,8 x 2,6-5,0 µm) von einem großen Zelltyp (3,8-6,0 x 4,8-7,0 µm). Kiss differenzierte 1996 eine kugelförmig-ovale Zellform (3,8-3,9 x 4,7-4,9 µm) und eine länglichere Stäbchenform (1,9-2,1 x 5,1-5,3 µm). Das Medium, das für die Kultivierung der Zellen verwendet wird, scheint ihre Zellmikromorphologie nicht zu beeinflussen (Guillot 1999). *M. pachydermatis* sprosst monopolar unter Entstehung einer unter dem Elektronenmikroskop erkennbaren Collarette auf der Zellwand der Mutterzelle (Slooff 1970). Zytoplasmatische Organellen waren denen vergleichbar, die für Hefen allgemein beschrieben werden (Swift 1965, Nishimura 1991). Die Größe des Nukleus entsprach der von *M. furfur*: 0,8 µm (Nishimura 1991).

Hyphenbildung kann bei *M. pachydermatis* im Gegensatz zu einigen lipid-dependenten *Malassezia*-Spezies (besonders *M. furfur*) nicht beobachtet werden (Guého 1996).

Nach siebentägigem Wachstum bei 32°C entstehen stumpf-glänzende, glatte Kulturen von etwa 3-5 mm Durchmesser (Guillot 1999), wobei Huang 1993 sowohl kleinere als auch größere Durchmesser beschrieb. Ursprünglich elfenbeinfarben dunkeln sie mit zunehmendem Alter und nehmen eine goldbraune Farbe an (Slooff 1970).

### 1.3.3 Physiologie und Biochemie der *Malassezia* spp.

In der Literatur finden sich nur wenige Daten über die Physiologie und Biochemie der lipiddependenten *Malassezia*-Hefen, da diese aufgrund ihrer ausgeprägten Tendenz zur Zusammenballung nur schlecht als Reinkulturen darzustellen sind. Darüber hinaus sind bekannte Standardassimilationstestungen wie das Kohlenhydratauxanogramm wegen ihrer Lipiddependenz nicht durchführbar. In der Gattung *Malassezia* zeigt allein die Spezies *M. pachydermatis* auf lipidfreien Nährböden Wachstum (Slooff 1970, Gordon 1979). Die übrigen *Malassezia* spp. benötigen Fettsäuren mit einer Kettenlänge von mehr als 12 Kohlenstoffatomen (Laurinsäure) als essentielle Voraussetzung für Wachstum, wobei

längerkettige Fettsäuren auch aus mittelkettigen Fettsäuren synthetisiert werden können (Shifrine 1963, Wilde 1968, Nazzaro 1976). Zur Kultivierung werden mit einer Lipidquelle überschichtete Basalmedien (z.B. Sabouraud Glukose Agar), Spezialnährböden (z.B. Dixon-Agar, van Abbe 1964) und andere lipidhaltige Medien (Guého 1996) verwendet.

Neben der Hydrolyse von Neutralfetten (Meinhof 1967) ist die Hydrolyse von Triacylglyceriden unter Freisetzung von Glycerol und freien Fettsäuren (Weary 1970, Caprilli 1973) beschrieben worden. Die Assimilation von Steroiden ist für Cholesterol und Cholesterolester nachgewiesen worden (Nazzaro 1977). Im Jahr 1996 schilderte Riciputo die Assimilation von Phospholipiden.

*Malassezia*-Hefen konnten in vitaminfreien Basalmedien wachsen (Nazzaro 1976). Sie nutzten sowohl organische als auch anorganische Stickstoffquellen (Slooff 1970, Salkin 1977), waren jedoch nach Angaben von Gordon 1979 und Kiss 1996 nicht in der Lage, Kaliumnitrat zu assimilieren.

*Malassezia*-Hefen sind resistent gegenüber Cycloheximid (400-1000 ppm), welches das Risiko einer Kontamination in der Kultur verringert (Ushijima 1981, Saez 1982). Die Wachstumsoptima liegen zwischen 32 und 37°C bei einem pH-Wert von 5,5-6,5 (Guillot 1996).

#### 1.3.4 Bisherige physiologisch-biochemische Untersuchungen der Spezies *M. pachydermatis*

Slooff berichtete 1970 auf der Grundlage von Assimilationstestungen für die lipophile, aber nicht lipiddependente Spezies *M. pachydermatis* von Wachstum mit D-Glukose, D-Mannitol, D-Sorbitol und manchmal mit Glycerol, Laktat und Succinat (siehe Tabelle 12). Sanguinetti publizierte 1984 Ergebnisse, die Wachstum mit D-Glukose und D-Mannitol und in wenigen Fällen mit Saccharose beschrieben. Dagegen konnten Laktat und Succinat nicht assimiliert werden (Tabelle 12). Während Kiss 1996 für Saccharose immer negative Wachstumsergebnisse erhielt (wie auch für Galaktose, Maltose, Trehalose, Cellobiose und Ribose), konnte sie biochemisch die Spezies in zwei Gruppen einteilen: Gruppe 1 unterschied sich von Gruppe 2 durch eine fehlende Assimilation von D-Mannitol und D-Sorbitol, eine fehlende Hydrolyse von Tween 80 und fehlendes Wachstum ohne Nikotinsäure (Tabelle 12).

Urea wurde hydrolysiert, die Catalasereaktion war positiv (Guillot 1996, Kiss 1996). Ferner wurden Esterase-, Peroxidase-, Lezithinase- und Caseinaseaktivitäten nachgewiesen, während kein getesteter Stamm positiv für Coagulase oder Hämagglutination war (Mathieson 1996,

Kiss 1996). Mancianti berichtete 2001 von den nachgewiesenen Enzymen saure Phosphatase und Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase. Ethanol wurde nicht assimiliert (Kiss 1996).

Als eine Besonderheit des Stickstoffstoffwechsels von *Malassezia*-Hefen zeigte sich eine Tryptophan-abhängige Synthese von Pigmenten und Fluorochromen. Dieser Effekt lässt sich insbesondere bei der Spezies *M. furfur* (Mayser und Wille 1998) aber auch bei einem Teil von *M. pachydermatis*-Isolaten induzieren (Mayser 2004), jedoch erst nach längerer Inkubationszeit und mit geringerer Ausbeute. Bei letzteren ist bisher nur der UV-Filter Pityriacitrin als Pigmentbestandteil nachgewiesen worden (Mayser 2004).

Interessant ist die Beschreibung von Stämmen mit einem erhöhten Lipidbedarf innerhalb der Spezies (Bond und Saijonmaa Koulunies 1995, Senczek 1999, Duarte 2002): Sie wuchsen entweder gar nicht oder nur spärlich auf Sabouraud Glukose Agar.

Wachstum ist möglich bei Temperaturen zwischen 25 und 41°C, bei einer Optimaltemperatur von 37°C (Slooff 1970, Sanguinetti 1984, Guillot 1995), wobei *M. pachydermatis* besonders kälteempfindlich (Midgley 1989), jedoch gut in flüssigem Stickstoff zu konservieren ist (Midgley 1989, Breierova 1991).

Gutes Wachstum wird auf Sabouraud Glukose Agar (SGA) erzeugt, dagegen schwaches Wachstum auf Blutagar (BA) und Dermatophyton-Test-Medium (DTM) (Sanguinetti 1984, Kiss 1996). *M. pachydermatis* wächst gleich gut unter aeroben, mikroaerophilen wie unter kapnischen Bedingungen, unter anaeroben Bedingungen jedoch nur schwach (Faergemann 1981). Das Wachstum ist optimal in einem pH-Bereich von 5,5-6,5, wobei neueste Untersuchungen einen breiteren Rahmen für das pH-Optimum veranschlagen: 4,0-8,0 (Matousek 2003).

### 1.3.5 Bisherige genetische Untersuchungen der Spezies *M. pachydermatis*

In den letzten Jahren sind genetische Analysetechniken in den Vordergrund gerückt mit der Perspektive auf eine einfache, schnell durchzuführende und zuverlässige Routinediagnostik (Guillot 1999).

Es zeigte sich jedoch, dass auch mit diesen Methoden *Malassezia*-Spezies eine hohe Varianz aufweisen (Guillot 1999). Kurtzmann (1994) und Midreuil (1999) berichteten übereinstimmend von einer hohen Rate der Nukleotid-Substitution zwischen den *Malassezia* spp. im Genus, die bei weitem die Werte in anderen Hefe-Genera übersteige. Dagegen berichten neueste Untersuchungen mit AFLP (amplified fragment length polymorphism)



sowohl für *M. pachydermatis* als auch für die anderen *Malassezia*-Spezies von spezifischen Charakteristika (Gupta 2004).

Im Jahr 1994 wandte Midgley eine restriction fragment length polymorphism (RFLP) Analyse von Zell-DNA an und fand neun verschiedene Genotypen in 50 *M. pachydermatis*-Isolaten. Mit derselben Methode aber unterschiedlichen Restriktionsenzymen wies Anthony im selben Jahr zehn Typen unter 32 Stämmen nach.

Guillot (1997) differenzierte *M. pachydermatis* mit der Methode der ribosomal large subunit (LSU) Sequenzierung in sieben Sequenztypen (Ia-Ig). Dabei bestätigte er jedoch die taxonomische Integrität der Spezies *M. pachydermatis*.

Midreuil identifizierte 1999 mittels multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) unter 52 Stämmen 27 verschiedene Genotypen.

Dagegen ergaben Untersuchungen mit Karyotyping (Boekhout 1998, Senczek 1999) einheitliche Bandenmuster für die untersuchten *M. pachydermatis*-Stämme. Laut Boekhout (1998) erwies sich Karyotyping als geeignete Methode zur Spezies-Identifikation im Genus *Malassezia*, während eine RAPD (random amplification of polymorphic DNA) für alle Spezies heterogene Ergebnisse zeigte.

Aizawa und Kano untersuchten 1999 und 2001 110 Isolate mit der Methode der RAPD (Aizawa 2001) und der chitin synthase 2 (CHS 2) Gensequenzanalyse (Kano 1999). Sie fanden vier verschiedene Genotypen (A, B, C und D) bei taxonomischer Integrität der Spezies *M. pachydermatis*. Chryssanthou beschrieb 2001 bereits bei sechs untersuchten *M. pachydermatis*-Blutisolaten sechs unterschiedliche RAPD-Bandenmuster.

## **1.4 Epidemiologie und Krankheitsbilder**

### **1.4.1 Epidemiologie und *Malassezia* spp. assoziierte Erkrankungen**

Hefen der Gattung *Malassezia* gehören nach Yarrow (1984) und Ingham (1993) zur residenten Mikroflora der menschlichen Haut und der Haut vieler Warmblüter. Mit Ausnahme von *M. pachydermatis* sind sie von einer Versorgung mit längerkettigen Fettsäuren abhängig, also obligat lipid-dependent (Lodder 1952), daher finden sie sich besonders in den talgdrüsenreichen Körperarealen (Marples 1965). Die menschliche Haut ist oft mit lipid-dependenten *Malassezia*-Spezies besiedelt, dagegen nur in wenigen Ausnahmen mit der vornehmlich bei Tieren auftretenden lipophilen Spezies *M. pachydermatis* (Bandhaya 1993).

Die Besiedelung nimmt insbesondere mit der Pubertät wegen der steigenden Talgdrüsenaktivität zu (Faergemann 1980). Auf klinisch unauffälliger Haut lässt sich *M. furfur* besonders am Kopf und Stamm bis zu 100% nachweisen (Martin-Scott 1952, Noble 1978). *Malassezia* assoziierte Erkrankungen beim Menschen sind:

a) *Pityriasis versicolor* (hyper- und hypopigmentierende, milchkaffeefarbene und schuppige Hautläsionen), die zu den häufigsten superfiziellen Mykosen der Haut gehört (Hay 1998). Sie ist weltweit verbreitet mit besonders hoher Inzidenz in tropischen Gebieten (nicht selten 50% der Bevölkerung). In Europa erreicht sie 0,5-1% der Bevölkerung mit Maximum in den Sommermonaten (Balus 1982). Der Nachweis erfolgt mikroskopisch im Nativpräparat.

Mit Ausnahme einer Einzelbeschreibung bei der Ziege ist die *Pityriasis versicolor* bei Tieren nicht bekannt (Bliss 1984).

b) *Das seborrhoische Ekzem* (entzündliche, rötliche, fettig-schuppige Areale besonders in Kopf- und Gesichtsregion = seborrhoische Regionen) mit chronischem Verlauf und zwei Häufigkeitsgipfeln, nämlich im Säuglingsalter und im Erwachsenenalter. Zusammenhänge zwischen dieser Erkrankung und *Malassezia*-Hefen konnten nur vereinzelt nachgewiesen werden (Heng 1990). McGinley stellte 1975 beim *seborrhoischen Ekzem* eine höhere Besiedelungsdichte mit *M.*-Hefen fest, Bergbrandt 1989 jedoch nicht. Bei der Therapie zeigten verschiedene Antimykotika Erfolge (Faergemann 1996).

c) *Malassezia-* (*Pityrosporum-*) *Follikulitis* (besonders im Brust- und Rückenbereich mit multiplen, klein follikulär gebundenen Papeln und starkem Juckreiz), die Potter 1973 von der *Pityriasis versicolor* abgrenzte.

Darüber hinaus sind systemische Erkrankungen durch eine *Malassezia*-Infektion nachgewiesen worden, insbesondere eine katheterassoziierte Sepsis bei Frühgeborenen (Chang 1998).

*Malassezia*-Hefen wurden auch in einen Zusammenhang mit *Papillomatosis confluens et reticulare* (Duverne 1966), *Akne vulgaris* (Marples 1973) und *Psoriasis vulgaris* (Paulino 2006) gebracht. Bei *atopischer Dermatitis (Neurodermitis)* zeigten Patienten häufiger positive *Malassezia* spezifische Antikörper (Young 1989, Wessels 1991).

Bei Tieren wurden *Malassezia* spp. insbesondere bei Haus- und Nutztieren gefunden (Gustafson 1960, Bond und Howell 1997, Duarte 1999, Crespo 2002).

In der Veterinärmedizin dominiert hauptsächlich *Malassezia pachydermatis* als Erreger einer Otitis externa beim Hund, gelegentlich auch bei der Katze (Weiss 2000). Zudem wird *M. pachydermatis* mit caninen Dermatitiden in Verbindung gebracht. Die seborrhoische Dermatitis zeigt sich in Talgdrüsenarealen als krustige bis fettige Hautveränderungen, einem Erythem und Haarausfall (Weiss 2000), die atopische Dermatitis stellt sich als Ekzem auf trockener Haut mit Haarausfall dar (White 1996).

#### 1.4.2 Epidemiologie und *M. pachydermatis* assoziierte Erkrankungen

Die lipophile Spezies *Malassezia pachydermatis* (Dodge 1935) [Synonyme: *Pityrosporum pachydermatis* (Weidman 1925), *Pityrosporum canis* (Gustafson 1955)] tritt speziell bei Tieren auf. Bei verschiedenen Säugetieren und Vögeln gehört sie zur residenten Flora der Haut und des äußeren Gehörganges (Baxter 1976, Kennis 1996, Crespo 2002). Bei Nagetieren konnte *M. pachydermatis* nicht (Guillot 1994), beim Menschen nur äußerst selten nachgewiesen werden (Noble 1981, Bandhaya 1993).

Besonders bei Hunden ist die Epidemiologie von *M. pachydermatis* wegen seiner hohen Inzidenz gut erforscht. In unterschiedlichen Untersuchungen wurde der Keim im äußeren Gehörgang bei gesunden Hunden in 15 bis 49% und bei Otitiden in 50-83% der Fälle nachgewiesen (Greene 1998, Rosychuk 2000, Crespo 2002, Girao 2005). Hajsig isolierte 1985 *M. pachydermatis* bei 58% von 57 gesunden Hunden von der Schleimhaut unterschiedlicher Körperregionen: Anus, Rektum, Vagina, Mund und Nase. Dufait kultivierte 1985 *M. pachydermatis* aus 86% von 94 Hunde-Haarproben; seinen Ergebnissen zu Folge war die Inzidenz bei gesunden und bei hauterkrankten Hunden gleich.

Bond und Saijonmaa Koulumies untersuchten 1995 40 gesunde Hunde unterschiedlicher Rassen auf *M. pachydermatis*. Der Nachweis erfolgte bei 53% im Anus und bei 28% in der Mundhöhle, außerdem in der Nase, unter der Vorhaut und an der Vagina. Eine Besiedelung der Haut wurde interdigital in 60%, auf der behaarten Haut in der Mundregion in 75% und im äußeren Gehörgang in 33% der Fälle festgestellt, selten an Axilla und Rücken. Im Jahr 2000 konnte Bond ergänzen, dass Haarfollikel nur selten betroffen sind. Kennis schilderte 1996 auch das Kinn und die Perioralregion als besonders befallen bei gesunden Hunden.

In einer Langzeitstudie wurde bei acht gesunden Beagles über zehn Wochen 14-tägig die Besiedelung der Haut untersucht. Dabei konnte ein Befall des äußeren Gehörgangs bei sieben und am Anus bei drei Hunden nachgewiesen werden (Bond 1996).

Ein unterschiedlicher Befall verschiedener Hunderassen wurde festgestellt. Danach waren Dachshunde (basset hounds), Cocker Spaniel, Pudel, und Terrierarten besonders befallen. Jedoch konnte weder das Geschlecht noch das Alter als Prädispositionsfaktor nachgewiesen werden (Plant 1992; Bond 1996, 2002). Im Gegensatz dazu fand Crespo 2002 keine signifikanten Rassen-, Geschlechts- noch Altersunterschiede bei Hunden und darüber hinaus auch nicht bei Katzen.

*M. pachydermatis* assoziierte Erkrankungen bei Tieren sind:

a) *Otitiden* - besonders betroffen sind Carnivoren, wobei die Inzidenz beim Hund deutlich größer ist als bei der Katze (Bond 1997, Crespo 2002). Weitere Fälle wurden bei Frettchen, Schweinen, Pferden, Vögeln, Füchsen und Primaten sowie Dromedaren beschrieben (Gustafson 1960, Midgley 1969, Saez 1982, Dufait 1985, Guillot 1994, Dinsdale 1995).

b) *Dermatitiden* - im Gegensatz zu Hunden sind Katzen nur wenig betroffen (Carlotti 1993, Godfrey 1998). Den ersten Fall bei einem Rhinoceros berichtete Weidmann 1925, Bauwens erneut 1996. Ferner gelang der Nachweis auch beim Bären (Salkin 1978) sowie bei Seelöwen (Guillot 1998, Nakagaki 2000).

Erkrankungsfälle beim Menschen beruhen vorwiegend auf Einzelberichten, z.B. von einer Beteiligung bei einer Tränengangsentzündung (Romano 1978). Ein besonderer Stellenwert kommt *M. pachydermatis* bei nosokomial-systemischen, speziell katheterassozierten Infektionen von Neu- und Frühgeborenen zu (Guého 1987, Mickelsen 1988, Marcon 1992, Chryssanthou 2001). Der Erreger wird, von Haustieren des Pflegepersonals ausgehend, eingeschleppt (Chang 1998) und persistiert trotz Reinigung des Brutkastens mindestens zwei Monate, obwohl er in der Umwelt sehr selten angetroffen wird (van Belkum 1994). Die beste Behandlung ist hier, den infizierten Katheter zu entfernen (Marcon 1992). Auch bei immunsupprimierten Menschen ist eine Infektion möglich (Rhie 2000). Die Symptome sind Fieber, Lethargie, Atemnot oder Bradykardie (Guého 1987).

#### 1.4.3 Therapie von *M. pachydermatis* assoziierten Erkrankungen

Gustafson propagierte 1955 *M. pachydermatis* als Pathogenitätsfaktor von Hundeotitiden. Auch gelang es ihm, mit dem Erreger das Krankheitsbild der Otitis externa auszulösen. Dufait beschrieb 1983 *M. pachydermatis* als Ursache für Dermatitiden bei Hunden. Er konnte Isolate kultivieren und die Dermatitiden erfolgreich antifungal therapieren. Mason bestätigte diese

Ergebnisse (1991). Bond schlug 1997 vor, von einer *Malassezia*-Dermatitis zu sprechen, wenn aus den Läsionen des Hundes vermehrt *M. pachydermatis* Populationen entnommen werden können und eine antifungale Therapie Erfolg hat.

Bei Hautinfektionen von Hunden konnten neben *M. pachydermatis* auch eine große Anzahl coagulase-positive *Staphylokokken* (besonders *Staphylococcus intermedius*) nachgewiesen werden, weshalb die beste Therapie sowohl antibakteriell als auch antifungal erfolgt (Bond und Mason 1998). Mischinfektionen mit Bakterien wie *Staphylococcus intermedius* und *Pseudomonas aeruginosa* konnten auch für Otitiden nachgewiesen werden (Mansfield 1990, Kiss 1994). Diese Mischinfektionen zeichnen sich auch durch die Fähigkeit der beteiligten Mikroorganismen aus, die Abbauprodukte des jeweils anderen verstoffwecheln zu können (Satelliten-Phänomen). Beispielsweise können Proteolyse-Produkte der *Malassezia*-Hefen von *Staphylococcus intermedius* (Staib 1971), bzw. Nikotinsäure des *Staphylococcus intermedius* von *Malassezia*-Hefen (Takahashi 1982) inkorporiert werden.

Therapeutische Möglichkeiten bieten sich in Form von Azol-Derivaten an, insbesondere Ketoconazol, das am meisten eingesetzt wird (Dorogi 2002). Im Falle einer *Malassezia*-Dermatitis beim Hund wird lokal ein 2%iges Miconazol/ 2%iges Chlorhexidin Präparat in Form eines Shampoos vorgeschlagen (Bond und Rose 1995). Die Erkrankung der Otitis externa wird am besten mit ketoconazolhaltigen Ohrentropfen behandelt (Kiss 1994).

Weseler regte 2002 die Verwendung von australischem Teebaum-(*Melaleuca alternifolia*) Öl an, dass ebenfalls eine sehr gute antibakterielle Wirkung haben soll.

#### 1.4.4 Pathogenese von *M. pachydermatis* assoziierten Erkrankungen

Die Pathogenese der *Malassezia*-Hefen allgemein ist nur wenig erforscht. Einzelne Faktoren, die die Proliferation von *M. pachydermatis* begünstigen, sind unter anderem die Feuchtigkeit, das Fettangebot und der pH-Wert des Milieus. Die Ursache seines Übergangs vom kommensalen zum pathogenen Organismus ist noch nicht bekannt - man vermutet Änderungen im Mikroklima der Hautoberfläche sowie immunologische Störungen der Haut (Guillot 1999).

Eine erhöhte Anhaftung der Zellen an Korneozyten bei *M. pachydermatis* assoziierter seborrhoischer Dermatitis von Dachshunden wurde 1998 von Bond und Lloyd als nicht entscheidend für die Pathogenese eingestuft. Ähnliche Ergebnisse legte Bergbrant 1994 in Bezug auf *M. furfur* vor: Die Pilzzellen hafteten humanen Korneozyten bei Gesunden besser

als bei seborrhoischen Dermatitiden an. Die Anhaftung scheint nicht direkt zu sein, sondern über Lipide als Mediatoren (Masuda 2001). Auch schlugen Chens Versuche 2002 und 2004 fehl, mit Extrakten von *M. pachydermatis* Keratinozyten des Hundes zur Proliferation in vitro anzuregen. Diese Ergebnisse legen seiner Auffassung nach nahe, dass die epidermale Hyperplasie bei *Malassezia*-Dermatitis nicht durch *M. pachydermatis* bedingt ist.

Die Peroxidaseaktivität von *M. pachydermatis* könnte nach Kiss (1994) eine Rolle bei der Entstehung von auftretendem Pruritus bei Otitis externa spielen. Nach neuesten Untersuchungen kommt die Eigenschaft der Pigmentbildung als Pathogenitätsfaktor in Betracht (Mayser 2004, Irlinger 2005). Demnach zeigen Pigmentbestandteile pharmakologische Eigenschaften wie die Hemmung des „respiratory burst“ in humanen Neutrophilen (Krämer und Kessler 2005) und die Induktion von Apoptosen bei humanen Melanozyten (Krämer und Podobinska 2005).

## 1.5 Fragestellung

Innerhalb der Spezies *M. pachydermatis* weisen ausgeprägte Unterschiede im Geno- (Guillot 1997, Midreuil 1999, Aizawa 2001) und Phänotypus (Kiss 1996) auf eine Heterogenität hin.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten sowohl physiologisch-biochemische als auch genetische Differenzierungsmethoden an einem umfangreichen Bestand an einheimischen Wildstämmen, den Referenzstämmen der Spezies *M. pachydermatis* CBS 1879 und 1892 und drei von Aizawa und Kano zur Verfügung gestellten Stämmen ihres Typs B angewendet werden. Letztere hatten mittels RAPD (Aizawa 2001) und Sequenzierung des CHS 2 Gens (Kano 1999) diese genetisch *M. furfur* besonders nahestehende Subgruppe gefunden.

Im Mittelpunkt stand die Beantwortung folgender Fragen:

1. Wie groß ist die Heterogenität innerhalb der Spezies *M. pachydermatis*, wie viele Untergruppen lassen sich a) physiologisch-biochemisch und b) genetisch abgrenzen? Lassen sich die physiologisch-biochemisch abgegrenzten Untergruppen auch molekulargenetisch bestätigen?

2. Ist auch die pigmentbildende Subgruppe der Spezies *M. pachydermatis* heterogen? Wie viele Untergruppen lassen sich eventuell a) physiologisch-biochemisch und b) genetisch abgrenzen?
3. Weist die pigmentbildende Subgruppe (ca. 11% der Stämme, Mayser 2004) genetisch ein charakteristisches Profil auf, das womöglich dem des Typs B (12% des Stammesgutes, Aizawa 2001) entspricht? Gelingt damit der Nachweis einer engen genetischen Verwandtschaft von *M. pachydermatis*-Pigmentbildnern und *M. furfur* auf der Grundlage ihrer gemeinsamen Stoffwechselleistung der Pigmentbildung?
4. Ist Pigmentbildung statistisch vorhersagbar anhand physiologisch-biochemischer bzw. genetischer Merkmale, im Hinblick auf eine schnelle und zuverlässige Routinediagnostik?
5. In wie weit gleichen sich die gebildeten Pigmente und Fluorochrome von *M. pachydermatis*-Pigmentbildnern und *M. furfur*? Handelt es sich bei schwachen Agarverfärbungen bei *M. pachydermatis*-Stämmen tatsächlich um Pigmentbildungen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Herkunft der verwendeten 210 Stämme

Es wurden drei verschiedene Gruppen von *M. pachydermatis*-Stämmen verwendet.

#### 2.1.1 Referenzstämme (2 Stämme)

Um standardisierte und mit anderen Arbeitsgruppen vergleichbare Ergebnisse zu erstellen, wurden definierte Referenzstämme der Spezies *M. pachydermatis* in die Untersuchungen mit einbezogen. Sie wurden vom Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS; Baarn, Niederlande) bezogen und sofort nach Erhalt kryokonserviert, um immer auf den definierten Referenzstamm zurückgreifen zu können.

Die Dauerkultur der Referenzstämme erfolgte bei 32°C auf modifiziertem (m-) Dixon-Agar (Guého 1996, Guillot 1997). Die Kulturen wurden in wöchentlichen Abständen auf frisch zubereitetem Agar weiterverimpft.

**Tabelle 1:** Die 2 verwendeten CBS-Referenzstämme

CBS 1879 T	<i>M. pachydermatis</i>	Ohr eines Hundes mit Otitis
CBS 1892	<i>M. pachydermatis</i>	Ohr eines Hundes

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands; T: type-strain

#### 2.1.2 Stämme von Dres. Aizawa und Kano, Japan (3 Stämme)

Aizawa und Kano von der Nihon University School of Veterinary Medicine in Japan hatten 2001 mittels RAPD (random amplified polymorphic DNA) und der Sequenzierung des Chitin-Synthase-2 Gens vier genetische Typen A, B, C und D gefunden. Darüber hinaus stellten sie eine besondere phylogenetische Nähe ihres Typs B zur Spezies *M. furfur* fest.

Drei Stämme des Typs B wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Die Stämme aus Japan wurden sofort nach Erhalt kryokonserviert, um immer auf sie zurückgreifen zu können. Außerdem wurde eine Dauerkultur der Stämme auf Selektivagar für pathogene Pilze (SPF) bei 32°C angelegt. Die Kulturen wurden in wöchentlichen Abständen weiterverimpft.



**Tabelle 2:** Die 3 verwendeten ASC-Stämme

ASC 2	<i>M. pachydermatis</i>	Haut eines Hundes mit SD
ASC 20	<i>M. pachydermatis</i>	Haut eines Hundes mit AD
ASC 21	<i>M. pachydermatis</i>	Haut eines Hundes mit AD

ASC: Animal dermatology Center, Nihon, Japan; SD: Seborrhoische Dermatitis; AD: Atopische Dermatitis

### 2.1.3 Einheimische Wildstämme (205 Stämme)

Veterinärmedizinisches Material (Abstriche aus dem äußeren Gehörgang, von der Haut, den Pfoten, etc. von Hunden und Katzen; siehe Tabelle 3) wurde von Dr. Weiss aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität Giessen bezogen. Pro Abstrich wurde je ein *M. pachydermatis*-Stamm isoliert.

Der Nachweis von *Malassezia*-Sproßzellen erfolgte mikroskopisch mit dem Nativpräparat. Einzelne *Malassezia*-Sproßzellen sind erkennbar an ihrer doppelten Wandstruktur und dem charakteristischen zur Oberfläche vertikalen Streifenmuster in den inneren Wandabschnitten (Slooff 1970). Nach Primärisolation wurden die *Malassezia*-Zellen auf einem Medium ohne Fett ausgestrichen, so dass nach dem Differenzierungsschema für *Malassezia*-Hefen nach Guého von 1996 nur non-lipiddependente *M. pachydermatis*-Zellen wachsen konnten.

Um eine Reinkultur eines *M. pachydermatis*-Stammes zu erhalten, wurde ein Verdünnungsausstrich (Süssmuth 1987) gemacht. Gemäß dieser Methode wurde mit einer Impföse so wenig Pilzmaterial in Zick-Zack-Strichen flach auf dem Agar ausgestrichen, so dass einzelne Kolonien voneinander getrennt wachsen konnten. Um eine versteckte Kontamination durch langsam wachsende Mikroorganismen ausschließen zu können, wurden die Platten eine Woche inkubiert, bevor eine isoliert gewachsene Kolonie als Reinkultur angesehen wurde. Diese erhielt eine Labornummer, wurde ausgestrichen und kryokonserviert.

**Tabelle 3:** Herkunft der verwendeten einheimischen Wildstämme

Herkunft	Anzahl der Isolate
Hund/Ohr	164 (80%)
Hund/Haut	16 (8%)
Katze/Ohr	7 (3,5%)
Hund/Haar	7 (3,5%)
Hund/Auge	3 (1,5%)
Hund/Pfote	3 (1,5%)
Hund/Rachen	2 (1%)
Katze/Haut	1 (0,5%)
Hund/Nase	1 (0,5%)
Hund/Vagina	1 (0,5%)

Darüber hinaus konnten weitere 22 Wildstämme (vorwiegend vom Hundeohr) nicht verwendet werden. 15 Stämme zeigten einen erhöhten Lipidbedarf und somit schwaches Wachstum auf lipidfreiem Selektivagar für pathogene Pilze (SPF, siehe 2.2.2). Sieben Stämme wuchsen zwar auf SPF, erbrachten aber trotz wiederholter Testungen auf lipidfreiem Kohlenhydratauxanogramm-Agar (siehe 2.3.1.5) kein Ergebnis, auch nicht für Wachstum mit der Positivkontrolle D-Glukose (siehe 3.1.5).

## 2.2 Inkubation und Kulturverfahren

Die Inkubation der Isolate fand generell bei 32°C in einem Brutschrank der Firma Heraeus (Darmstadt, BRD) statt.

### 2.2.1 Modifizierter Dixon-Agar

Die Dauerkultur der CBS-Referenzstämme erfolgte auf *modifiziertem (m-) Dixon-Agar*.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung des *m-Dixon-Agars* (für 250 ml)

3,6% Malzextrakt	9g	Malzextrakt-Bouillon, Merck, Darmstadt, BRD
0,6% Pepton (Casein)	1,5 g	Pepton aus Casein, Merck
2,0% Ochsen-galle	5,0 g	Ox-Bile, desiccated, Fa. Oxoid, Unipath, Basingstoke, Großbritannien
1,0% Tween 40	2,5 ml	Tween 40 Atlas, Sigma, St. Louis, USA
0,4% Olivenöl	1,0 ml	aus der Apotheke kaltsterilisiert
1,2% Agar	5g	Agar Agar reinst, Merck
0,04% Cycloheximid	0,1 g	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
0,005 % Chloramphenicol	0,0125 g*	Merck
	auf 250ml mit Aq. dest. auffüllen	

\* Die Stammlösung bestand aus 6,25 mg Chloramphenicol/ ml aqua dest. und wurde bei -20°C gelagert; 2 ml der Stammlösung wurden zugegeben. Die entsprechenden Lösungen Chloramphenicol und Cycloheximid wurden steril filtriert (Millex-GS-Filter; Filtergröße: 22 µm; Millipore, Molsheim, Frankreich) und dem Medium nach Autoklavieren in einem Autoklaven (Melag, Berlin, BRD) bei 1 bar über 30 min und Abkühlen auf etwa 50°C zugesetzt, da beide Substanzen temperaturempfindlich sind (Merck Index 1996).

Jeweils 10 ml des Mediums wurden unter einer Laminar-air-flow Sicherheits-Arbeitsbank (Uniequip, Martinsried, BRD) in sterilen Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgegossen.

### 2.2.2 Selektivagar für pathogene Pilze

Die Primäransucht von *M. pachydermatis*-Kulturen sowie die Dauerkultur aller Wildstämme erfolgte auf *Selektivagar für pathogene Pilze* (SPF, fettfrei, glukosehaltig).

*Selektivagar für pathogene Pilze* (SPF; Merck, Darmstadt, BRD):

Herstellerangaben für 1 Liter Medium: Pepton 10,0 g, Glukose 10,0 g, Cycloheximid 0,4 g, Chloramphenicol 0,05 g, Agar 12,5 g.

Der pH-Wert bewegt sich zwischen pH 6,5 und pH 7,0.

Da den verwendeten Standardmedien (m-Dixon-Agar, SPF) Cycloheximid und Chloramphenicol zugesetzt sind, zeigte sich jeweils eine nur geringe oder keine Kontamination der Kulturen mit Bakterien bzw. Schimmelpilzen der Anflugflora.

## 2.3 Untersuchungsmethoden

Es wurden zwei verschiedene methodische Ansätze gewählt: einerseits physiologisch-biochemische Untersuchungen und andererseits die genetische Methode der random amplification of polymorphic DNA (RAPD).

Ziel war es, die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden einander gegenüberzustellen und ggf. zu bestätigen.

Sämtliche Arbeitsschritte aller Untersuchungen wurden steril unter einer Laminar-air-flow Sicherheits-Arbeitsbank (Uniequip) durchgeführt.

### 2.3.1 Physiologisch-biochemische Untersuchungsmethoden

Alle Testungen wurden mit vier Tage alten Isolaten durchgeführt (Ausnahme: *Prüfen der Konsistenz*: sechs Tage).

#### 2.3.1.1 Bestimmung der Keimzahl

Exemplarisch wurde die Anzahl an Zellen eines Stammes im Inokulat bestimmt, das in den unterschiedlichen *qualitativen* physiologisch-biochemischen Tests verwendet wurde. Ermittelt wurde die mit einer Platin-Impföse (3 mm Durchmesser; neoLab, Heidelberg, BRD) aufgenommene Keimzahl.

Die Pilzzellen wurden mit einer Platinöse vom Agar aufgenommen und in je 1 ml 0,9% NaCl auf einem Vortex-Reagenzglasrüttler (Bender und Hobein, Zürich, Schweiz) zur Verminderung von Klumpenbildung suspendiert. Die Zellsuspension wurde einmal durch Zentrifugation (3000 U/ min, 3 min; Hettich Zentrifuge, Rotana, BRD) und Absaugen des Überstands mittels Wasserstrahlpumpe sowie Resuspension des Pellets mit einer definierten Menge 0,9% NaCl gewaschen. Man erhielt die Ausgangssuspension.

Die Ausgangssuspension wurde 1:100 mit NaCl verdünnt und auf den Reagenzglasrüttler gegeben. Abschließend wurden davon 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und nach Erythrozytenmodus (5 Gruppenquadrate) unter dem Phasenkontrastmikroskop (Dialux, Leitz, Wetzlar, BRD) ausgezählt.

Die Zellzahl  $n$  in der verdünnten Ausgangssuspension pro µl errechnete sich nach folgender Formel:

$$\begin{aligned}n/\mu\text{l} &= S/(V_k \times N_k) \\ &= S/(0,25 \times 10^{-3}\mu\text{l} \times 80) \\ &= S/(20 \times 10^{-3}) \\ &= S \times 50/\mu\text{l}\end{aligned}$$

$n/\mu\text{l}$  = Anzahl der Zellen pro Mikroliter Suspension

$S$  = Summe der ausgezählten Zellen in fünf Gruppenquadraten

$V_k$  = Volumen über einem Kleinstquadrat ( $0,25 \times 10^{-3}\mu\text{l}$ )

$N_k$  = Anzahl der ausgezählten Kleinstquadrante ( $16 \times 5 = 80$ )

Beachtet werden musste der jeweilige Verdünnungsfaktor (hier Faktor 100), mit dem multipliziert wurde.

Ebenso wurde mit dem Volumen der Ausgangssuspension multipliziert, um die absolute Zellzahl  $n$  zu erhalten.

#### 2.3.1.2 Prüfen der Konsistenz

In Anlehnung an Kiss (1996) lag diesem Test das Kriterium der unterschiedlichen Feuchtigkeit der Kolonien eines *M. pachydermatis*-Stammes nach sechs Tagen Wachstum bei 32°C zugrunde. Die Konsistenz wurde beim drucklosen Ausstreichen auf SPF ermittelt.

#### 2.3.1.3 Spaltung von Eskulin

Zur Verbesserung der Differenzierung von *M. furfur*, *M. slooffiae* und *M. sympodialis* hatte Mayser 1997 die  $\beta$ -Glukosidase-Aktivität mittels Eskulin-Agar (Sanofi Diagnostic Pasteur, Freiburg, BRD) getestet. Der in 100 ml Flaschen gelieferte Agar wurde im Autoklaven (Melag) verflüssigt und dann in sterile Reagenzgläser mit Verschluss gegossen. Die *M. pachydermatis*-Stämme wurden mittels einer ausgeglühten Platinöse tief in den Agar inokuliert und anschließend bei 32°C inkubiert. Die Spaltung von Eskulin in Eskuletin, Glukose und ein Eisensalz wurde durch eine Verfärbung des Agars von hellbraun nach dunkelbraun/ schwarz angezeigt. Das Testergebnis wurde nach fünf Tagen in Bezug auf eine Negativkontrolle ohne Inokulat beurteilt.

#### 2.3.1.4 Catalase-Aktivität

Der Catalase-Nachweis erfolgte als Objektträgertest (Guillot 1996). Die Catalase katalysiert die Zerlegung der bei Oxydationsreaktionen entstehenden Peroxyde ( $2 \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). Ein Tropfen des ID color Catalase-Reagenz ( $\text{H}_2\text{O}_2$  10 Vol. 3%, Dickungsmittel 2%, Evans-Blau 0,00125%; Bio-Mérieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich) wurde auf einen Objektträger gegeben und darin eine Kolonie von *M. pachydermatis* mit einer Impföse eingerührt. Ein Aufschäumen zeigte die Catalase-Aktivität des Stammes an.

#### 2.3.1.5 Kohlenhydratauxanogramm

In Anlehnung an Kiss (1996) wurde entsprechend Barnett (1990) ein Medium auf Nitrogen-Basis verwendet, das selbst keine Kohlenhydrate oder Lipide enthält. Bei gebotener Stickstoffquelle wurde die Assimilation von Zuckern, Zuckeralkoholen und Säuren an den verschiedenen *M. pachydermatis*-Stämmen untersucht.

### 2.3.1.5.1 Substrate

Folgende Substrate wurden in einem Kohlenhydratauxanogramm getestet und in folgender Reihenfolge angeordnet:

1= Laktat	(Merck)	6= D-Sorbitol	(Sigma-Aldrich)
2= Saccharose	(Merck)	7= Succinat	(Sigma-Aldrich)
3= D-Glukose	(Merck)	8= D-Mannitol	(Sigma-Aldrich)
4= L-Sorbose	(Merck)	9= Lactose	(Merck)
5= Glycerol	(Merck)		

D-Glukose diente hierbei als Positivkontrolle.

Die Substrate wurden in Form gesättigter Lösungen (Merck Index 1996) bzw. als Laktat und Glycerol „reinst“ verwendet, die in einem Kühlschrank bei 2 bis 8°C aufbewahrt wurden.

### 2.3.1.5.2 Medium

Vorbereitend wurde eine Nitrogenbasis-Stammlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD) nach Herstellerangaben angefertigt.

**Tabelle 5:** Nitrogenbasis-Stammlösung nach Herstellerangaben (für 100 ml)

6,7g	Yeast Nitrogen Base with Amino Acids	Sigma-Aldrich
100 ml	Aqua dest.	Pharmacia, Erlangen, BRD

Nach gutem Umrühren auf einem Magnetrührer (IKA, Staufen, BRD) und vollständigem Auflösen des Yeast Nitrogen Base with Amino Acids wurde die Stammlösung mit sterilen Millex-GS-Filtern (Filtergröße: 22µm; Verwendung zur Sterilisation von wässrigen Lösungen; Millipore, Molsheim, Frankreich) filtriert und in einem herkömmlichen Kühlschrank bei 2 bis 8 °C gelagert.

Der Hersteller empfahl für das „final medium“ ein Verhältnis der Nitrogenbasis-Stammlösung zum Agar von 1:9, weshalb 11 ml Nitrogenbasis-Stammlösung zu 99 ml Agar gegeben wurden. Dem Agar (2 g Agar Agar reinst + 99 ml aqua dest.) wurde nach 30 min Autoklavieren bei 1 bar und ca. 50°C wegen der Hitzelabilität des Nitrogens von der Nitrogenbasis-Stammlösung (hatte Zimmertemperatur) zugegeben.

Der pH-Wert dieses Kohlenhydratauxanogramm-Agars auf Nitrogenbasis lag bei pH 5,0.

#### 2.3.1.5.3 Herstellung

In 50 ml auf Körpertemperatur abgekühlten, flüssigen Kohlenhydratauxanogramm-Agar wurde eine Zellsuspension (1ml; Konzentration: 4 Platinösen Substanz des zu testenden *M. pachydermatis*-Stammes pro ml aqua dest.) eingemischt (Magnetprüher, IKA). Danach wurde der Agar in sterilen Petrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm (Greiner, Frickenhausen, BRD) ausgegossen. Nach Verfestigung des Mediums wurden neun sterile runde Filterpapierstücke (für jedes zu testende Substrat eins) mit einer Pinzette im größtmöglichen Abstand voneinander aufgelegt (siehe auch Abbildung 1).

Abschließend wurden je 10 µl der neun Substrate auf die Filterpapierstücke pipettiert; das Suspensionsvolumen musste möglichst klein sein, um ein Verlaufen bzw. Diffusion zu Nachbarsubstraten zu verhindern. Die Petrischalen wurden ca. 15 min zum Trocknen der Substrate stehen gelassen, mit Klebestreifen versiegelt und dann in einem Brutschrank bei 32°C sieben Tage inkubiert.

Zur Auswertung ist ein Hintergrund mit günstigen Lichtverhältnissen erforderlich, gegen den man die Petrischale hält - hier hat sich ein helles Fenster am besten bewährt.

#### 2.3.1.5.4 Herstellung der sterilen Filterpapierstücke

Handelsübliches Filterpapier wurde mit einem handelsüblichen Locher gelocht und die Stücke wurden 30 min bei 1 bar autoklaviert.

#### 2.3.1.6 Lipidauxanogramm

In Anlehnung an eine Studie von Mayser und Scheurer (1996) zur Hydrolyse von Fettsäureestern bei *M. furfur* wurden *M. pachydermatis*-Isolate untersucht.

Als Substrat wurden Polyoxysorbitanfettsäureester (Tween<sup>®</sup>; Sigma, Deishofen, BRD) gewählt. Die Durchführung entsprach der Methode von Guillot (1996).

**Tabelle 6:** Bezeichnung der verwendeten Tween<sup>®</sup> - Ester und ihre Fettsäureanteile

Bezeichnung	Fettsäureanteil
Tween <sup>®</sup> - 20 = Polyoxysorbitanmonolaurat	50% C12:0 + C14:0, C16:0 und C18:0
Tween <sup>®</sup> - 40 = Polyoxysorbitanmonopalmitat	90% C16:0, 10% C18:0
Tween <sup>®</sup> - 60 = Polyoxysorbitanmonostearat	50% C16:0, 50% C18:0
Tween <sup>®</sup> - 80 = Polyoxysorbitanmonooleat	70% C18:1 + C18:2, C16:0 und C18:0

Als weiteres Substrat wurde Cremophor EL (Sigma), ein Polyethylenglykol-(35)-Rizinusöl-Ester bei *M. pachydermatis*-Isolaten angewandt. Damit wurde die Untersuchung von Mayser und Haze (1997) komplettiert, in der sich zeigte, dass von *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta* nur *M. furfur* Cremophor EL assimilieren konnte.

#### 2.3.1.6.1 Herstellung

In 25 ml auf Körpertemperatur abgekühlten, flüssigen Selektivagar für pathogene Pilze (SPF, Merck) wurde eine Zellsuspension (0,5 ml; Konzentration: 4 Platinösen Substanz des zu testenden *M. pachydermatis*-Stammes pro ml aqua dest.) eingemischt. Anschließend wurde der Agar in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm (Nunc) ausgegossen. Nach Verfestigung des Mediums wurden vier Löcher für die Tweens 20, 40, 60, 80 und in einigen Fällen noch ein fünftes Loch für Cremophor EL mit einer 3 mm Stanze eingestanzt. Die zuvor 30 Minuten im Brutschrank bei 30°C aufbewahrten Substanzen wurden in die Stanzlöcher hineinpipettiert (jeweils 5 µl). Das Ergebnis wurde nach drei Tagen Inkubation in einem Brutschrank bei 32°C abgelesen. Eine stattgefunden Hydrolyse zeigte sich durch Bildung von Trübungszone(n) (Calciumsalze und Wachstum) um die Stanzlöcher (Abbildung 2).

#### 2.3.1.7 Pigmentierungstests

Als eine Besonderheit des Stickstoffstoffwechsels von *Malassezia*-Hefen zeigte sich eine Synthese von Pigmenten und Fluorochromen, wenn Tryptophan (TRP) als alleinige Stickstoffquelle angeboten wurde. Dieser Effekt lässt sich insbesondere bei der Spezies *M. furfur* induzieren (Mayser 1998) und ist zudem bei einem Teil von *M. pachydermatis*-Isolaten nachgewiesen worden (Mayser 2004).

Auf diese bisherigen Pigmentierungsergebnisse für *M. pachydermatis* aufbauend wurden in Vorversuchen unterschiedliche Pigment-induzierende Medien getestet:

1. Dixon-Agar mit TRP ermöglichte nur schwache Pigmentbildungen (Zusammensetzung siehe 2.2.1, anstelle von Casein wurde in derselben Konzentration TRP zugegeben).
2. P-Agar (pigment induction agar, Tabelle 7), bei dem den Zellen nachträglich Tryptophan in einem Stanzloch zur Verfügung gestellt wurden; brachte auch nur schwache Pigmentbildungen.



3. P-Agar ohne Lipide ließ wie bereits beschrieben (Mayser 2004) keine Pigmentbildung zu.
4. P-Agar ohne Glukose zeigte nur minimale bzw. fehlende Pigmentbildungen.
5. P-Agar (pigment induction agar; Mayser 2004, Tabelle 7) wurde als das beste Screening-Medium bestätigt.

**Tabelle 7:** P-Agar (für 1 Liter Medium)

20 g	Agar	Merck, Darmstadt, BRD
990 ml	Aqua dest.	Pharmacia, Erlangen, BRD

Nach 30 min Autoklavieren bei 1 bar wurde dazu gegeben:

30 ml	Tween 80	Sigma, Deishofen, BRD
-------	----------	-----------------------

Bei ca. 50 °C wegen Hitzelabilität wurde zugegeben:

10 g	L-Tryptophan	Sigma
------	--------------	-------

\*Auf eine sterile Filtration von L-Tryptophan wurde wegen der geringen Löslichkeit von 10 g/l verzichtet (Merck Index 1996)

Abschließend wurde steril filtrierte Glukose (10 g in 10 ml aqua dest.) zugefügt:

10 g	D-Glukose	Merck, Darmstadt, BRD
------	-----------	-----------------------

Der pH-Wert lag bei pH 5,0.

Der pH-Abhängigkeit der Pigmentbildung wurde damit Rechnung getragen, da pH 5,0-5,5 physiologisch für die Hautoberfläche eines Tieres ist.

Modifiziert wurde der P-Agar (Mayser 2004) durch eine Steigerung der TRP-Zugabe von 3 g/l auf 10 g/l, um auch schwache Pigmentbildungen zu detektieren. Die Glukosezugabe von 10 g/l wurde beibehalten.

Interessant war der Zusatzversuch mit P-Agar ohne Glukose, dieser sollte zeigen, ob neben dem Vorhandensein von Lipiden auch Glukose für die Pigmentbildung von *M. pachydermatis* essentiell ist.

Bei P-Agar ohne Glukose wurde auf Zugabe von D-Glukose verzichtet (siehe Tabelle 7). Der pH-Wert lag auch hier bei pH 5,0.

#### 2.3.1.7.1 Durchführung

Jeweils 25 ml der Medien wurden in Petrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc) ausgegossen.

Den Medien P-Agar und P-Agar ohne Glukose wurden dann für jeden zu testenden Stamm zwei Suspensionstropfen (= Doppelansatz) von je 10 µl mit einer Eppendorf Pipette aufgetropft (Konzentration: 1 Platinöse Pilzsubstanz des zu testenden *M. pachydermatis*-Stammes pro 100 µl aqua dest.). Ziel war es durch ein „dickes“ Inokulat schnell Wachstum und ggf. eine gut erkennbare Pigmentbildung hervorzurufen.

Darüber hinaus wurde noch als Positivkontrolle ein nachgewiesenes schwach pigmentbildender Stamm in derselben Konzentration in der Mitte der Schale aufgetropft.

14 Tage bei 32°C wurde in einem Brutschrank inkubiert und danach das Ergebnis abgelesen.

Pigment konnte als braune Verfärbung des Mediums rund um die Suspensionstropfen identifiziert werden (Abbildung 3).

#### 2.3.1.8 Auswertung der physiologisch-biochemischen Testergebnisse mit einem Zahlencode

Um eine tabellarische Übersicht über die Testausgänge der 210 Stämme zu gewinnen und eine Typisierung vornehmen zu können, wurde ein fünfstelliger Zahlencode gewählt. Die erste Stelle des Zahlencodes beschreibt den Ausgang des Tests „Konsistenz“, die zweite Stelle den des „Eskulintests“, die dritte den des „Catalasetests“, die vierte den des „Kohlenhydratauxanogrammtests“ sowie die fünfte Stelle den des „Pigmentierungstests“. Den verschiedenen Testausgängen sind im Ergebnisteil dieser Arbeit entsprechende Zahlen zugeordnet. So ergibt sich für jeden Stamm ein spezifischer Zahlencode und damit ein spezifisches physiologisch-biochemisches Profil (siehe Tabelle 13 im Anhang).

### 2.3.2 Genetische Untersuchungen durch RAPD

Die genetischen Untersuchungen erfolgten an 114 *M. pachydermatis*-Stämmen. Dabei wurden alle physiologisch-biochemisch abgegrenzten Gruppen genetisch untersucht. Die Stämme waren vier Tage bei 32°C auf SPF kultiviert worden.

Die Analyse von Gensequenzen wurde mit der RAPD-Methode (random amplification of polymorphic DNA) durchgeführt. Diese war 1990 sowohl von Williams als auch von Welsh

erstmalig beschrieben worden und deckt zufällig amplifizierte DNA-Polymorphismen auf. Mit derselben Methode hatten Aizawa und Kano 2001 vier verschiedene Gentyphen (A, B, C und D) gefunden. Die RAPD ist eine geeignete Methode, um feine genetische Unterschiede in Isolaten zu erkennen, die beispielsweise für die restriction fragment length polymorphism (RFLP) Analyse gleich sind (Trevino-Castellano 2003).

Die Reproduzierbarkeit der RAPD-Bandenmuster wurde gewährleistet, indem die Experimente wiederholt durchgeführt wurden.

Die RAPD-Untersuchung gliederte sich in drei Schritte:

2.3.2.1 Extraktion von DNA

2.3.2.2 RAPD

2.3.2.3 Gelelektrophorese

#### 2.3.2.1 Extraktion von DNA

1  $\mu$ l Pilzsubstanz wurde mit einer Einmalimpfeschlinge (Nunc) aufgenommen. Die DNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung eines DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, BRD) gemäß der Herstellerempfehlung:

- Suspension der Pilzsubstanz in *180  $\mu$ l Puffer ATL* in einem Eppendorf-Röhrchen
- *20  $\mu$ l Proteinase K* dazugeben und auf einem Rüttler gut durchmischen
- bei *56 °C* für *15 min* im Wasserbad inkubieren
- *200  $\mu$ l Puffer ATL* dazugeben und auf dem Rüttler gut durchmischen (*15 sec*)
- bei *70 °C* für *10 min* im Wasserbad inkubieren
- *200  $\mu$ l Ethanol absolut* dazugeben und auf dem Rüttler gut durchmischen (*15 sec*)
- ganze Lösung in ein *Säulchen* (Eppendorf-Röhrchen mit Filter) überführen, dieses steht in einer *Collection-Tube* (= *C-Tube* = *Auffangröhrchen*)
- bei *8000 UpM* für *1 min* abzentrifugieren, Filtrat mit *C-Tube* wegwerfen, *Säulchen* in eine neue *C-Tube* stellen
- *500  $\mu$ l Puffer AW 1* in das *Säulchen* geben (= waschen)
- wieder bei *8000 UpM* für *1 min* abzentrifugieren, *C-Tube* wegwerfen, *Säulchen* in eine neue *C-Tube* stellen
- *500  $\mu$ l Puffer AW 2* in das *Säulchen* geben (= 2. Mal waschen)

- nochmal nun *14000 UpM* für *3-4 min* abzentrifugieren (Ziel ist es, alle Pufferreste aus dem *Säulchen* zu bekommen), *C-Tube* wegwerfen, *Säulchen* in ein Eppendorf-Röhrchen stellen
- *100 µl Puffer AE* auf das *Säulchen* geben und *5 min* bei Raumtemperatur inkubieren (dieser Puffer eluiert die DNA)
- bei *8000 UpM* für *1 min* abzentrifugieren (Puffer und gereinigte DNA gehen in Eppendorf- Röhrchen über, in dem man sie aufbewahrt)

Die DNA wurde zur Aufbewahrung bei – 18 °C eingefroren.

### 2.3.2.2 RAPD

Unter Verwendung von Ready-To-Go RAPD-Analysis-Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) wurde mit der gewonnenen DNA die RAPD durchgeführt. Ready-To-Go RAPD-Analysis-Beads enthalten PCR-Puffer, Taq DNA Polymerase und MgCl<sub>2</sub> zur Amplifizierung. Auch hier wurde nach Herstellerangaben gearbeitet:

In ein RAPD-Analysis-Bead wurde hineinpipettiert:

- *17,5 µl aqua dest.* ( nicht mischen!)
- *2,5 µl Primer* ( nicht mischen!)
- *5 µl DNA Extrakt* und dann *gut* mischen !
- *50 µl Parafinöl* (Sigma)

Das RAPD-Analysis-Bead wurde danach in einen *Thermo-Cycler* (Hybaid Limited, Ashford, UK) gestellt und das Programm RAPD wurde gestartet (Dauer ca. 4h):

- *94 °C* bei *5 min* (Denaturierung)
  - *94 °C* bei *1 min* (Denaturierung)
  - *40 °C* bei *2 min* (Annealing)
  - *72 °C* bei *1 min* (Polymerisation)
- } 40 Zyklen
- *72 °C* bei *5 min*
  - *4 °C* und Hold

#### *2.3.2.2.1 Primer*

Der verwendete Primer hatte die Sequenz: 5'-AGC CGC CTC CAT GGC CCC AGG-3' (Name: Rp-Malas-1, Sigma-ARK, Darmstadt, BRD). In Vorversuchen wurde dieser Primer Rp-Malas-1 (Laborname: FM-1) im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Giessen von Dr. Hossain unter drei weiteren Primern: Primer 1 (5'-d[GGTGCGGGAA]-3'), Primer 2 (5'-d[GTTTCGCTCC]-3'), Primer 5 (5'-d[AACGCGCAAC]-3') (Amersham Pharmacia Biotech) als der mit dem größten diskriminatorischen Index ermittelt. Letzterer lag bei  $D = 0,954$  und basiert auf dem Simpson-Index als rechnerische Maßzahl für Verschiedenheit (Hunter 1989). Auch im Sinne der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen Aizawas und Kanos (2001) wurde für diese Studie ebenfalls Rp-Malas-1 verwendet.

#### *2.3.2.3 Gelelektrophorese*

Die amplifizierte Gensequenzen wurden mittels Gelelektrophorese auf 2% Agarosegel (2,5 h bei 150 V und Raumtemperatur) aufgetrennt.

Die Methode der Gelelektrophorese wurde vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Giessen übernommen und bestand aus der Vorbereitung des Gels für die Gelelektrophorese sowie ihrer Durchführung.

##### *2.3.2.3.1 Vorbereitung*

8 g Agarose (Life Technologies, Paisley, Schottland) wurden mit 400 ml TBE Puffer (s.u.; 10-fach mit aqua dest. verdünnt) verrührt.

Das Gemisch wurde bei zwischenzeitlichem Umrühren 5 min aufgekocht. Es entstand eine klare Lösung ohne Klumpen und ohne Blasen.

In den Gelschlitten eines Gel casting Systems (Life Technologies) wurden die entsprechenden Kämmen eingesetzt und die abgekühlte Agaroselösung ausgegossen. Nachdem das Gel nach 1 h bei Raumtemperatur fest geworden war, wurden die Kämmen herausgenommen und das Gel in die Elektrophoresekammer des Gel casting Systems gegeben. Abschließend wurde das Gel mit TBE Puffer (s.u.; 10-fach mit aqua dest. verdünnt) überdeckt.

#### 2.3.2.3.2 Durchführung

Um Verzerrungen auszugleichen, die durch verschiedene Gellaufängen entstanden, wurden die Positionen der amplifizierten Banden (Molekulargewichts-Größen) durch den jeweils mitgelaufenen Molekulargewichts-Marker (1Kb<sup>+</sup> Marker DNA Ladder, s.u.) standardisiert.

In eine Vertiefung einer Gewebekulturplatte (Microplate, 96 Wel, Greiner) wurden jeweils hineinpipettiert:

- 6 µl Auftragspuffer (enthält DNA-Farbstoff SYBR-Gold, s.u.)
- 8 µl DNA eines *M. pachydermatis*-Stammes bzw. vom Marker

Danach wurde gut gemischt und anschließend wurden davon 12 µl in eine Geltasche gegeben. Daraufhin wurden an die Elektrophoresekammer 150 V angelegt und die Elektrophorese bei Raumtemperatur 2,5 h durchgeführt. Abschließend wurde das Gel bei UV-Licht (254 nm Wellenlänge) mit einer Digitalcamera fotografiert (Image Master VDS System, Amersham Pharmacia Biotech).

#### 2.3.2.3.3 Materialien

- *TBE-Puffer* (in 1 l aqua dest. waren enthalten:)

121,1 g Tris                    MG= 121,14 (Roth, Karlsruhe, BRD)

51,3 g Borsäure                    (Merck)

3,7 g EDTA                    MG= 372,24 (SERVA, Heidelberg, BRD)

Abschließend wurde mit HCl (Merck) auf pH 8 eingestellt.

- *Auftragspuffer* (die Stammlösung enthielt:)

4800 µl *Probenpuffer*

200 µl *SYBR-Gold*

- *Probenpuffer (=Ficoll-Puffer)*

1,25 g Ficoll (Merck) wurden pro 7,5 µl aqua dest. zugegeben und über Nacht aufgelöst, am nächsten Tag wurde eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau (Merck) hinzugegeben (die Färbung sollte nicht zu stark sein, um den Gellauf nicht zu stören).

- *SYBR-Gold* (DNA-Farbstoff)

*SYBR-Gold* (Mo Bi Tec, Göttingen, BRD) wurde 1:100 mit DMSO (Dimethylsulfoxid; Merck) verdünnt.

- *1Kb<sup>+</sup> Marker DNA Ladder* (nach Herstellerangaben waren in 400 µl enthalten:)

20 µl 1Kb<sup>+</sup> Marker (Invitrogen, Karlsruhe, BRD)

40 µl TE Puffer

100 µl Ficoll (0,5 g in 2 ml aqua dest. + Spatelspitze Bromphenol)

240 µl aqua dest.

- *TE Puffer*

10 mM Tris (Roth)

1 mM EDTA (SERVA)

Abschließend wurde mit HCl (Merck) auf pH 8 eingestellt und autoklaviert.

#### 2.3.2.4 Datenanalyse der RAPD-Ergebnisse

Die Datenanalyse der RAPD-Ergebnisse von *M. pachydermatis*-Isolaten geschah über Vergleiche ihrer Bandenmuster mittels des Softwareprogramms Gelcompar 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgien). Letzteres wird vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Giessen in Verbindung mit RAPD verwendet.

Dice-Koeffizienten ( $S_{AB}$ ) von Probenpaaren entscheiden im Softwareprogramm Gelcompar 4.0 über Gleichheit der genetischen Profile. Sie werden mit Hilfe der "Dice Metrik" (Dice 1945) auf Grundlage der Bandenpositionen berechnet. Bei  $S_{AB} = 1$  liegt ein genetisch identisches Probenpaar vor. Auf diesen Dice-Koeffizienten beruhen wiederum Clusteranalysen, die im nächsten Schritt die genetischen Beziehungen unter *allen* getesteten Isolaten darstellen: Ein Cluster besteht aus genetisch gleichen Isolaten. Clusteranalysen werden mit Hilfe der arithmetischen Methode der unweighted paired group method using arithmetic average (UPGMA, Sneath 1973) durchgeführt. In Dendrogrammen können diese genetischen Beziehungen unter den Isolaten visualisiert werden (siehe Abbildung 6). Der Schwellenwert der Dice-Koeffizienten für die Bildung von Clustern wurde in dieser Studie vorrangig hoch mit  $S_{AB} = 0,96$  angesetzt, aber auch mit  $S_{AB} = 0,75$  und  $S_{AB} = 0,64$  deutlich niedriger.

Auch die Molekulargewichtsgrößen der amplifizierten Banden wurden mit Gelcompar 4.0 unter Verwendung einer Kalibrierungskurve durch die Referenzbanden des Molekulargewichts-Markers (1Kb Plus DNA Ladder) berechnet.

Das Vorhandensein (1) oder Nichtvorhandensein (0) jeder einzelnen Bande wurde separat in einer Tabelle in der Art eines 1/0 Codes für anschließende statistische Auswertungen (siehe 2.5) notiert.

## 2.4 Analyse des Pigments von *M. pachydermatis*

Ist Tryptophan die einzige Stickstoffquelle im Nährboden, so bildet nicht nur die Spezies *M. furfur* ein braunes Pigment, das aus einer großen Anzahl bisher unbekannter Farbstoffe und Fluorochrome besteht (Mayser und Wille 1998), sondern auch ein Teil der Spezies *M. pachydermatis* (Mayser 2004).

Dieser exemplarische Versuch diente primär der Überprüfung der Frage, ob es sich bei den braunen Höfen um die Suspensionstropfen sowohl beim starken als auch beim schwachen *M. pachydermatis*-Pigmentbildner (siehe Ergebnisse 3.1.7) tatsächlich um Pigmentbildung handelt.

Im Falle eines positiven Nachweises von Pigment im Nährmedium sollte das Pigment des starken und schwachen *M. pachydermatis*-Pigmentbildners verglichen werden und der Pigmentbildung des Referenzstammes der Spezies *M. furfur* CBS 1878 gegenübergestellt werden (Mayser und Wille 1998).

Das Pigment von *M. pachydermatis* wurde wie für *M. furfur* beschrieben erst als Rohextrakt gewonnen, dann über Säulenchromatographie aufgereinigt und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

### 2.4.1 Gewinnung des Pigments als Rohextrakt

Zur Gewinnung von Rohextrakt wurden auf SPF gewachsene Kolonien (vier Tage alt) des über den Pigmentierungstest (siehe 2.3.1.7) ermittelten stärksten Pigmentbildners (Stamm der Labornummer 178) und eines schwachen Pigmentbildners (Stamm 78) verwendet. Sie wurden mit sterilen Wattestäbchen auf P-Agar ausgestrichen und 14 Tage (Ablesezeitpunkt beim Pigmentierungsversuch 2.3.1.7) inkubiert. Anschließend wurde, wie bei Mayser und Wille 1998 beschrieben, der Inhalt von 20 Agarplatten mit einem Pürierstab (Quelle, Fürth, BRD) püriert und das Pigment unter der Wirkung von zugegebenem Ethylacetat (EE, Merck) über ca. 48 h extrahiert. Danach wurde dieses Rohextrakt über Glaswolle gefiltert und in einem Scheidetrichter mit aqua dest. aufgegossen und ausgeschüttelt. Es bildeten sich zwei Phasen, die sich mit dem Scheidetrichter trennen ließen: eine obere Ethylacetat-Phase und eine untere Wasserphase, die noch Agarreste enthielt und verworfen wurde. Diese Vorreinigung des Rohextraktes ermöglichte eine bessere Trennung über die anschließend durchgeführte Säulenchromatographie. Das Lösungsmittel Ethylacetat wurde anschließend in einem



Rotationsverdampfer (Rotavapor; Büchi, Flawil, Schweiz) abgedampft. Der Rückstand wurde mit 4 ml Ethanol aufgenommen und bei - 18°C eingefroren.

#### 2.4.2 Säulenchromatographie: Gelpermeationschromatographie

Lipophiles Sephadex LH 20 (Porengröße 25-100 µm, Sigma) ist ein hydroxyproliertes Derivat des Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Es wird für die Gelpermeationschromatographie sowie die Normalphasenverteilungs- und Adsorptionschromatographie von z. B. Lipiden, Steroiden, Fettsäuren, Hormonen und Vitaminen verwendet (Henke 1995).

Über eine Flash-Säulenchromatographie wurde Rohextrakt unter UV-Licht (Typ 131200, Desaga-GmbH, Heidelberg, BRD) von 254 und 366 nm Wellenlänge in einzelne Farb-Fractionen aufgetrennt.

Die halbvoll mit dem Elutionsmittel Methanol (Merck) gefüllte Säule (NS29 mit Fritte Durchmesser 30 mm, Por.1, PTFE-Küken NS 14/2,5 mm spitz ausgezogen, Nutzlänge ca. 525 mm, Pfeuffer, Hannover, BRD) wurde mit der vorbereiteten Gelsuspension unter Vermeidung von Luftblasenbildung gefüllt. Nach Aufbringen des Rohextraktes (4 ml in Ethanol entsprechen 20 Agar-Platten) wurde eine Flash-Birne (1000 ml; Schott Duran, Wertheim, BRD) aufgesetzt, mit Methanol gefüllt und Druck über einen Gummiball aufgebaut.

Die in getrennten Glasgefäßen aufgefangenen Fractionen wurden mit einem Rotationsverdampfer getrocknet und in etwa 2,5 ml Ethanol aufgenommen.

Sephadex LH 20 wurde regelmäßig regeneriert, um verminderte Trenneigenschaften durch Verschmutzung des Gels zu reduzieren. Dabei wurde nach zwei Methoden verfahren:

##### *Methode A:*

Dem Sephadex wird 0,2 N NaOH zugeführt und unter gelegentlichem Schwenken über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird die Lauge über eine Nutsche abgesaugt und das Gel bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes mit aqua dest. gewaschen.

##### *Methode B:*

Nach durchgeführter Chromatographie bleibt das Sephadex auf der Säule. Nach Einsickern von ca. 1 ml 2 N HCl wird die Säule mit Methanol gespült, bis ein pH von 7 erreicht ist.

### 2.4.3 Dünnschichtchromatographie

Die durch die Gelpermeationschromatographie aus dem Rohextrakt gewonnenen Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie mit DC-Platten Kieselgel 60 (Merck) weiter aufgetrennt. Die Substanzen wurden unter Verwendung eines Camag Linomat IV (Camag, Muttenz, Schweiz) aufgetragen und mit dem Laufmittel Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3 entwickelt. (Laufkammern: Desaga, Heidelberg; Filterpapier: 20 x 20 cm, Camag)

**Tabelle 8:** Einstellung des Linomaten

Plattenbreite	200 mm
Bandbreite	10 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	7 sec/ $\mu$ l
Startposition horizontal	10mm
Startposition vertikal	20 mm
Zwischenraum	7 mm
Aufzutragendes Volumen	20 $\mu$ l
Druck Hauptventil	> 100 bar
Druck Reduzierventil	5 bar

Die Charakterisierung der einzelnen Fraktionen erfolgte über die Beschreibung der DC-Platten im sichtbaren Licht und UV-Licht bei 254 und 366 nm. Im UV-Licht werden in den Fluorochromen Elektronen angeregt, die bei Zurückfallen in ihren alten Zustand Licht einer bestimmten Spektralfarbe emittieren. Darüber hinaus wurden die Rf-Werte (Retentionsfaktor= Quotient aus der Entfernung einer Substanz vom Startpunkt und der Laufmittelstrecke) ermittelt.

### 2.5 Statistische Methoden

Ziel dieser Arbeit war es, aus einer großen Anzahl an genetischen und biologischen Variablen diejenigen herauszufinden, die Pigmentbildung statistisch vorhersagen können. Dazu wurde durch das Institut für Medizinische Statistik der Universität Giessen ein logistisches Regressionsmodell angewendet. Es handelt sich hier um eine explorative Datenanalyse. Die verwendeten p-Werte (Wahrscheinlichkeitswerte) sind deshalb rein deskriptiv zu verstehen. Aus diesem Grund wird bei der Beschreibung der Ergebnisse auf den geschützten Ausdruck „statistisch signifikant“ verzichtet. Die Arbeit generiert in einem neuen Forschungsbereich

Hypothesen, die jedoch, um verallgemeinernde Aussagen zu treffen, durch weitere Studien validiert werden müssen.

In einem ersten Schritt wurden unter Verwendung von univariaten Methoden (Abbildungen 9 und 10 im Anhang) die für statistische Modelle in Frage kommenden Parameter ausgewählt. Die Auswahlkriterien waren:

1. Eine genügend große Häufigkeit des Auftretens der Merkmalsausprägungen in der Stichprobe.
2. Deutliche Unterschiede in der Verteilung der Ausprägungen bei den Pigmentbildnern.

Für die gewählten Parameter wurden in einem zweiten Schritt, für genetische und physiologisch-biochemische Parameter getrennt, jeweils ein multivariates logistisches Regressionsmodell angewendet. Mit Hilfe der resultierenden odds ratios konnte dann die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Pigmentbildung unter der Bedingung bestimmter Konstellationen der Merkmalsausprägungen der Variablen berechnet werden (Abbildungen 9 und 10).

Für die logistische Regression wurden die Merkmalsausprägungen der physiologisch-biochemischen Variablen mit 1/0 codiert (1= Merkmal positiv, 0= Merkmal negativ). Ebenso wurde mit jeder amplifzierten Bande verfahren (1= vorhanden, 0= nicht vorhanden).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Physiologisch-biochemische Untersuchungsmethoden

#### 3.1.1 Bestimmung der Keimzahl

Die Keimzahl, die mit einer Platinöse (Durchmesser 3 mm) aufgenommen wurde, betrug durchschnittlich  $150 \times 10^6$  Zellen.

#### 3.1.2 Prüfen der Konsistenz

Es konnten zwei verschiedene Typen unterschieden werden:

121 Stämme (= 58%): *wässriger Film* (= Zahlencode 1, siehe Tabelle 13 im Anhang)

89 Stämme (= 42%): *deutlich trockener bis bröckelig* (= Zahlencode 2)

Die Oberfläche der gewachsenen Kolonien war homogen und glatt. Die Kolonien waren größtenteils nicht abgrenzbar ineinander verwachsen.

Bei erneuter Testdurchführung zeigten sich 90% der Ergebnisse stabil.

#### 3.1.3 Spaltung von Eskulin

Die Spaltung von Eskulin wurde durch eine Verfärbung des Agars von hellbraun nach dunkelbraun/ schwarz angezeigt. Bei der Intensität der dunkelbraun/ schwarzen Färbung gab es Unterschiede. Es war nicht möglich, diese reproduzierbar zu differenzieren.

Es konnte ein Ergebnis abgelesen werden:

210 Stämme (= 100%): *positives Spaltungsergebnis* (= Zahlencode 1)

Bei erneuter Testdurchführung entsprachen alle Ergebnisse denen der ersten Testung.

### 3.1.4 Catalase-Aktivität

Ein positives Testergebnis zeigte sich unmittelbar nach Zugabe des Stammes zum Reagenz durch aufsteigende Gasblasen (= freigesetzter Sauerstoff) mit anhaltender Schaumbildung.

Auch hier konnte ein Ergebnis abgelesen werden:

210 Stämme (= 100%): *positives Catalase-Ergebnis* (= 1)

Bei erneuter Testdurchführung entsprachen alle Ergebnisse denen der ersten Testung.

### 3.1.5 Kohlenhydratauxanogramm

Es zeigten sich hauptsächlich drei verschiedene Assimilationsprofile (Tabelle 9):

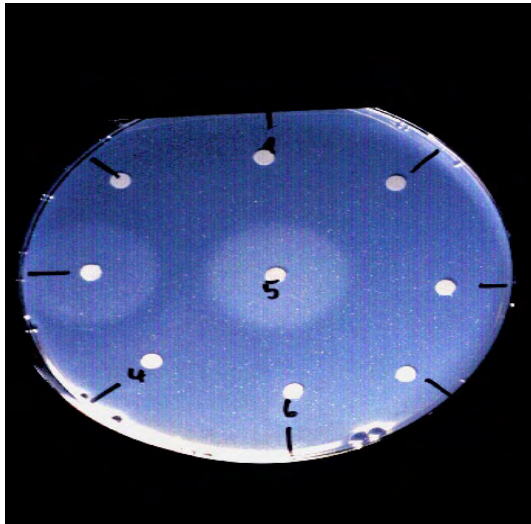
1. *D-Glukose und Glycerol* (siehe Abbildung 1)
2. *D-Glukose, Glycerol und D-Mannitol*
3. *D-Glukose, Glycerol, D-Sorbitol und D-Mannitol*

Diese drei Profile wiesen 201 Stämme (96%) auf.

Die Ableseergebnisse waren unterschiedlich deutlich.

**Tabelle 9:** Die Assimilationsprofile der 210 Stämme

	<i>D-Glukose Glycerol</i>	<i>D-Glukose Glycerol D-Mannitol</i>	<i>D-Glukose Glycerol D-Sorbitol D-Mannitol</i>	<i>D-Glukose Glycerol D-Sorbitol Succinat D-Mannitol</i>	<i>D-Glukose Glycerol D-Sorbitol</i>	<i>D-Glukose D-Sorbitol Succinat D-Mannitol</i>	<i>D-Glukose</i>
Zahlen- code	1	2	3	4	5	7	8
Anzahl Stämme	109 (52%)	14 (7%)	78 (37%)	3 (1,5%)	4 (2%)	1 (0,5 %)	1 (0,5 %)



**Abbildung 1:** Das häufigste Kohlenhydrat-Assimilationsprofil von *M. pachydermatis* (bei 109 Stämmen = 52%): *D-Glukose* (3) und *Glycerol* (5) werden assimiliert

Nur fünf der getesteten neun Substrate konnten eindeutig assimiliert werden (Tabelle 10). *D-Glukose* diente als Positivkontrolle und wurde von jedem Stamm verstoffwechselt, *Glycerol* von 208 Stämmen. Wachstum bei *D-Sorbitol* und *D-Mannitol* trat meist gemeinsam auf (siehe auch Tabelle 9).

**Tabelle 10:** Metabolisierung der einzelnen Substrate

	<i>D-Glukose</i>	<i>Glycerol</i>	<i>D-Mannitol</i>	<i>D-Sorbitol</i>	<i>Succinat</i>
Metabolisierung bei x Stämmen	210 (100%)	208 (99%)	96 (46%)	86 (41%)	4 (2%)

Während *Saccharose*, *L-Sorbose* und *Lactose* immer ein negatives Wachstumsergebnis aufwiesen, war bei *Laktat* oft ein sehr schwacher, diffuser Ansatz von Wachstum zu erkennen.

Bei sieben Stämmen von ursprünglich 217 Stämmen (siehe 2.1.3) konnte trotz mehrmaligem Testen kein Ergebnis festgestellt werden. Da sie auf SPF wuchsen, hätten sie zumindest bei *Glukose* Wachstum zeigen müssen. Es kann angenommen werden, dass entweder das *Glukose*angebot für diese Stämme zu gering war, oder dass von den Nachbarsubstraten ein wachstumshemmender Effekt ausging.

Alle Substrate wurden in einem minimalen Volumen aufgetropft, das einen Einfluss auf das Wachstum beim Nachbarsubstrat verhindern sollte. Den Beobachtungen in Vorversuchen zu Folge ging ein solcher Einfluss besonders von *D-Glukose* und *Glycerol* aus, bei denen meist

ein starkes Wachstum entstand; dieses konnte beim Nachbarsubstrat sowohl Wachstum generieren als auch hemmen. Bei anderen Substraten war auch folgendes Phänomen zu erkennen: Es war kein Wachstum um die Auftropfstelle von zwei benachbarten Substraten entstanden, jedoch in der Mitte zwischen den Auftropfstellen, was bedeutete, dass Wachstum nur bei Anwesenheit beider Substrate möglich war.

Bei wiederholter Testung mit Kohlenhydratauxanogrammen waren die Ergebnisse bei 84% der Stämme stabil.

Mit *D-Mannitol*, *D-Sorbitol* und *Succinat* gab es Abweichungen bei wiederholter Messung: Bei 5% *D-Mannitol*-, 20% *D-Sorbitol*- und 43% *Succinat*-Verstoffwechslern fehlte das jeweilige Assimilationsmerkmal. 6% der Isolate die zuvor kein *D-Mannitol* und 11% der Isolate, die zuvor kein *D-Sorbitol* verstoffwechselten, wiesen das jeweilige Assimilationsmerkmal dann auf.

### 3.1.6 Lipidauxanogramm

Im Tween-Hydrolase-Test wurden zwei verschiedene Ergebnisse abgelesen. Einmal war Tween 20 *positiv* genauso wie auch Tween 40, 60, 80 *positiv* waren. Um den Suspensionstropfen war jeweils ein opaleszenter Hof zu erkennen (Bildung von Calciumsalzen durch Hydrolyse von Lipiden sowie Wachstum der Pilzzellen; siehe Abbildung 2). Das andere Mal war Tween 20 *negativ*, während Tween 40, 60, 80 jeweils *positiv* waren. Im Hemmhof bei Tween 20 war meistens eine schwache Ringbildung zu sehen (Abb. 2). Diese ist schon beschrieben worden (Mayser 1998) und könnte für einen toxischen Effekt von Abbauprodukten stehen. Außerhalb des Hemmhofs bei Tween 20 wurden Calciumsalze gebildet (Abb. 2).

*Testergebnisse von 89 auf Tween-Hydrolase getestete Stämme* (siehe Tabelle 13):

4 Stämme (= 4%): *positives* Tween 20-Hydrolase-Ergebnis (= 1)

85 Stämme (= 96%): *negatives* Tween 20-Hydrolase-Ergebnis (= 2)

Da sich der Test angesichts des überwiegenden Ausgangs 2 als ungeeignet erwies, *M. pachydermatis* zu differenzieren, wurden nur 89 Stämme, die zufällig ausgewählt wurden, getestet.

Es wurden alle 89 Stämme ein zweites Mal getestet. Die Ergebnisse waren identisch mit denen des ersten Tests.

Der Cremophor EL-Assimilations-Test wurde nur in einigen Fällen durchgeführt, um zu klären, ob *M. pachydermatis* neben *M. furfur* (Mayser 1997) Cremophor hydrolysieren kann. Auch dieser Versuch führte zu zwei verschiedenen Ergebnissen. Einmal war um das Stanzloch ein opaleszenter Hof mit Wachstum der Hefezellen zu erkennen, um den ein dünner wachstumsschwacher Ring gezogen war (Abb. 2). Zum anderen gab es nur den Hemmhof um das Stanzloch ( Abb. 2).

*Testergebnis von 29 auf Cremophor EL-Assimilation getestete Stämme, die zufällig ausgewählt wurden* (siehe Tabelle 13):

19 Stämme (= 66%): *positives* Cremophor EL-Assimilations-Ergebnis (= 1)

10 Stämme (= 34%): *negatives* Cremophor EL-Assimilations-Ergebnis (= 2)

Es wurden alle 29 Stämme ein zweites Mal getestet. Bei allen 29 Stämmen entsprach das Ergebnis dem der ersten Testung.



**Abbildung 2: Tween- und Cremophor-Hydrolyse von *M. pachydermatis*** (oben rechts Tween 20, im Uhrzeigersinn Tween 40, 60, 80, in der Mitte Cremophor)  
links: Tween 20 (oben rechts) und Cremophor (Mitte) werden im Hemmhof nicht hydrolysiert  
rechts: Tween 20 (oben rechts) und Cremophor (Mitte) werden hydrolysiert



### 3.1.7 Pigmentierungstests

Als die beste Screenings-Methode erwies sich der Test auf P-Agar mit einer Tryptophan- und Glukose-Zugabe von jeweils 10 g/l Medium (siehe Material und Methoden 2.3.1.7). Prinzipiell konnte die Intensität der Pigmentbildung durch eine Variation der Zugabemenge von Tryptophan und Glukose verändert werden. Mit den genannten TRP- und Glukosekonzentrationen konnten auch schwache Pigmentbildungen erkannt werden. Zudem war eine Unterscheidung von starken und schwachen Pigmentbildungen möglich.

Pigment wurde in Form von braunen Höfen um die Suspensionstropfen identifiziert.

#### A: Pigmentierungstest auf P-Agar

Auf P-Agar bildeten die Stämme u.a. braunes Pigment direkt um die Impfpunkte. Es traten drei verschiedene Phänomene auf:

1. *Pigment* (Abbildung 3)
2. *kein Pigment* (Abb. 3)
3. *kein Pigment aber ein weißer Ring* (Abb. 4)

Um Ansätze einer Pigmentbildung besser erkennen zu können (insbesondere um gegenüber einer Verfärbung des Mediums durch TRP-Zerfall unterscheiden zu können), konnte Pigment, da es fluoresziert, zudem unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und 366 nm detektiert werden.

*Das Testergebnis* (siehe Tabelle 13):

- 84 Stämme (= 40%): *Pigmentbildung* (= Zahlencode 1)
- 73 Stämme (= 35%): *keine Pigmentbildung* (= 2)
- 53 Stämme (= 25%): *keine Pigmentbildung, aber Bildung eines weißen Ringes* (= 3)

Zusätzlich wurde zwischen starker und schwacher Pigmentbildung unterschieden; diese Intensitätsunterschiede (ungefähr 18% starke und 22% schwache Pigmentbildner) waren in den Subkulturen allerdings nicht immer konstant.

Bei wiederholter Testung war das Ergebnis für 92% der Stämme identisch.



**Abbildung 3: Pigmentsynthese von *M. pachydermatis* auf P-Agar** (im Doppelansatz pro Stamm)

oben: Pigmentbildner mit der Synthese von braunem Pigment

unten: Nicht-Pigmentbildner ohne Synthese von Pigment und ohne Bildung eines weißen Ringes



**Abbildung 4: Bildung eines weißen Ringes von *M. pachydermatis* auf P-Agar** (im Doppelansatz)

Nicht-Pigmentbildner mit der Bildung eines weißen Ringes

B: Zusatzversuch: Pigmenttest auf P-Agar ohne Glukose

Auf P-Agar ohne Glukose bildeten die Stämme nur minimal bzw. kein Pigment, hier traten drei unterschiedliche Phänomene auf. Es bildete sich direkt um die Impfpunkte entweder:

### 1. *ein entfärbter Hof im Agar* (Abbildung 5)

Der Hof war ringförmig. Er erschien im Kontrast zum übrigen Agar, dessen Farbe mit der Zeit dunkler wurde (TRP-Zerfall), entfärbt. Je nach Position der Lichtquelle erschien der Hof jedoch auch schwach pigmentfarben. Auch unter UV-Licht konnte Pigment nicht eindeutig nachgewiesen werden.

### 2. *ein weißer Ring* (Abb. 5)

Die Ringgröße wie auch die –intensität waren auffällig unterschiedlich. In Abhängigkeit der Zeit gewannen die Ringe an Durchmesser und wurden auch intensiver.

### 3. *keine Veränderung außer Wachstum der Kolonien*

*Das Testergebnis (nach 2 Wochen):*

#### 40 Stämme (= 19%): *entfärbter Hof im Agar*

Besonderheiten: Etwa 50% dieser Stämme wiesen um den *entfärbten Hof* zusätzlich einen diskreten *weißen Ring* auf. Nach fünf Wochen war bei der Mehrzahl der Stämme (80%) ein deutlicher *weißer Ring* gewachsen.

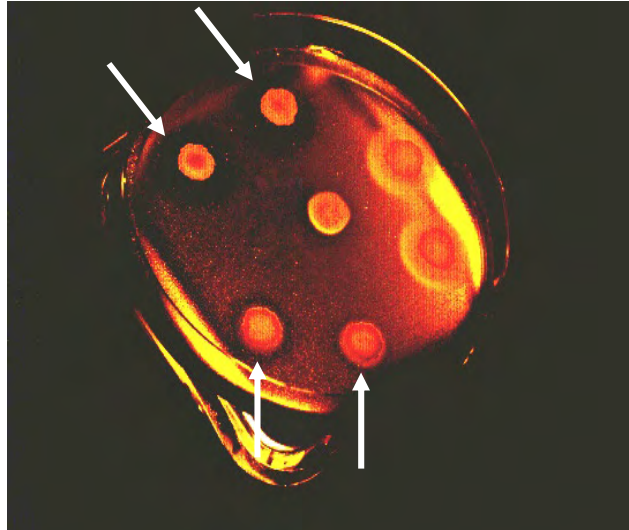
#### 166 Stämme (= 79%): *weißer Ring*

Besonderheiten: Um den *weißen Ring* war immer auch ein meist sehr dünner *entfärbter Hof im Agar* zu sehen.

#### 4 Stämme (= 2%): *keine Veränderung*

Besonderheiten: Nach fünf Wochen war in 3 Fällen ein *weißer Ring* gewachsen und einmal ein *entfärbter Hof im Agar* entstanden.

Bei nochmaligem Testen zeigten sich 91% der Ergebnisse stabil. Allerdings bestanden Größenunterschiede beim *entfärbten Hof im Agar* sowie Größen- und Intensitätsunterschiede beim *weißen Ring*.



**Abbildung 5: entfärbter Hof im Agar und weiße Ringbildung auf P-Agar ohne Glukose**  
 (Die Petrischale wurde auf einer Lampe liegend fotografiert.)  
 links oben und unten: *entfärbter Hof im Agar* (im Doppelansatz; weiße Pfeile)  
 rechts oben: *weiße Ringbildung* (im Doppelansatz)  
 Mitte: Positivkontrolle mit *weißer Ringbildung*

### 3.2 Zusammenfassung der physiologisch-biochemischen Ergebnisse

In dieser Arbeit konnten durch die physiologisch-biochemischen Tests der Pigmentbildung, des Kohlenhydratauxanogramms, der Catalase- und  $\beta$ -Glukosidase-Aktivität und der zusätzlichen Bestimmung der Konsistenz der Kolonien an 210 *M. pachydermatis* Stämmen 25 verschiedene physiologisch-biochemische Profile differenziert werden (Typen 1-25, Tabelle 13). Neun Stämme wiesen ein einzigartiges Profil auf (Typen 11, 12, 14, 19, 22, 23, 24, sowie ASC 2 = Typ 13 und CBS 1879 = Typ 25, Tabelle 13). Den am häufigsten gefundenen Typen wiesen 32 Stämme (15%) auf. Er besitzt eine wässrige Konsistenz, *D-Glukose-* und *Glycerol-*Assimilation sowie eine weiße Ringbildung auf P-Agar (Typ 3, Tabelle 13).

Die Pigmentbildner weisen physiologisch-biochemisch acht verschiedene Profile auf (Typen 1, 4, 7, 11, 15, 18, 20, 23; grau unterlegt in Tabelle 13).

Für den Referenzstamm der Spezies *M. pachydermatis* CBS 1879 wurde die Assimilation von *D-Glukose*, *D-Mannitol* und *D-Sorbitol* sowie *Succinat* nachgewiesen; er bildete kein Pigment und keinen weißen Ring. Der zweite Referenzstamm CBS 1892 zeigte neben der Verstoffwechslung von *D-Glukose*, *Glycerol*, *D-Mannitol* und *D-Sorbitol* zusätzlich eine schwache Pigmentbildung. Beide Referenzstämmen waren trocken (Tabelle 13).

### 3.3 Ergebnisse der RAPD-Untersuchungen

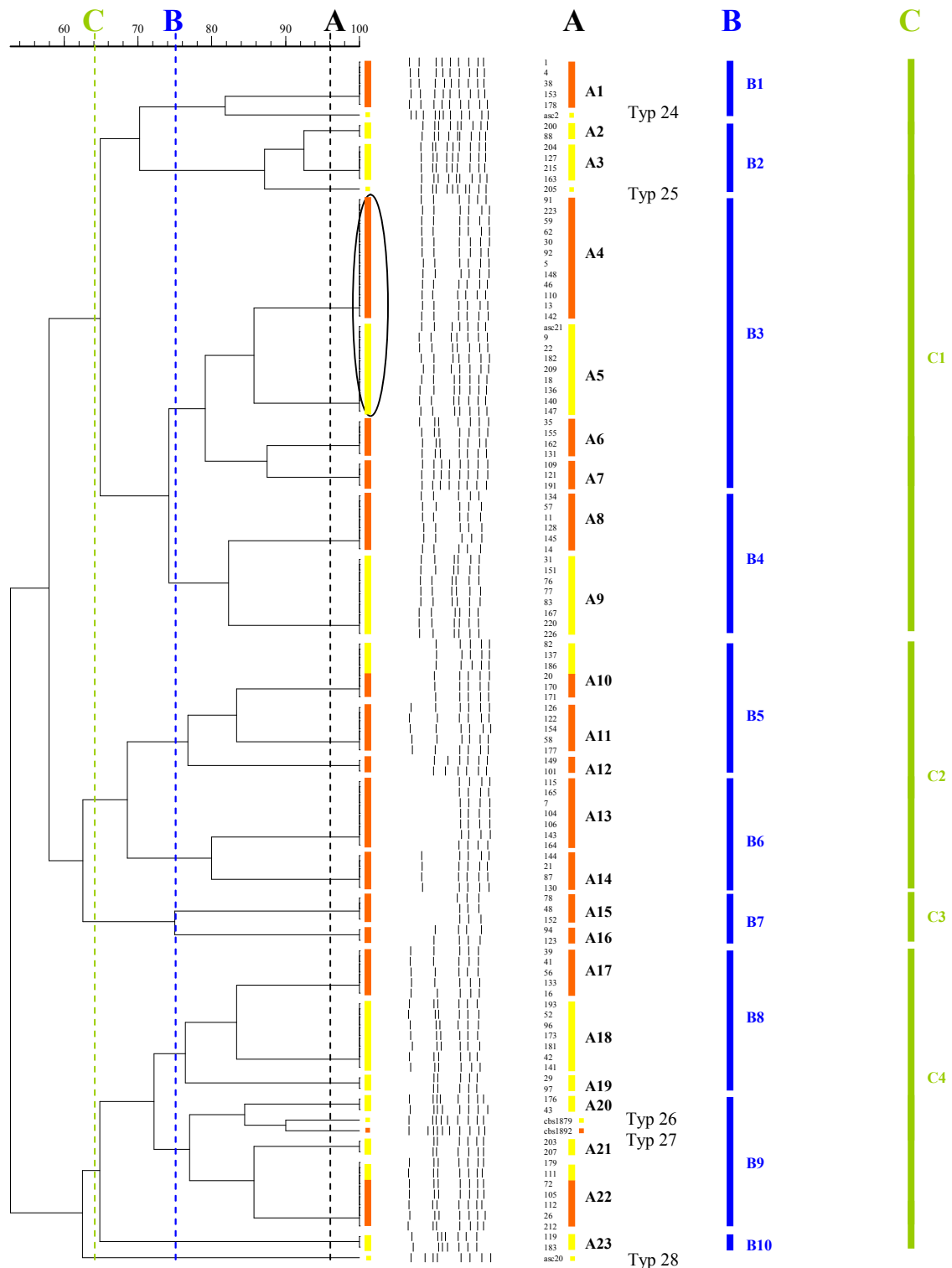
Eine RAPD Analyse wurde an 114 Stämmen durchgeführt. In Vorversuchen im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Giessen wies der Primer Rp-Malas-1 unter vier untersuchten Primern den größten diskriminatorischen Index auf und wurde für diese Studie verwendet. Rp-Malas-1 produzierte RAPD-Profile mit bis zu elf Banden (z.B. bei Isolat ASC 2; Cluster A 2, Abbildung 6). Die Reproduzierbarkeit der RAPD-Bandenmuster wurde gewährleistet, indem die Experimente wiederholt durchgeführt wurden. Die genetischen Verwandtschaftsbeziehungen der untersuchten Isolate, die aus der RAPD Analyse mit dem Primer Rp-Malas-1 hervorgingen, sind in einem Dendrogramm (Abbildung 6) dargestellt.

Wurde der Schwellenwert der Dice-Koeffizienten ( $S_{AB}$ ) für die Bildung von Clustern mit  $S_{AB} = 0,96$  hoch angesetzt (schwarze gestrichelte Linie A in Abb. 6), konnten unter 114 Isolaten 28 Genotypen unterschieden werden. Diese 28 Genotypen verteilen sich auf 23 Cluster (A 1- A 23; Abb. 6) und fünf einzelne Isolate (Typ 24 = ASC 2, Typ 25 = Stamm 205, Typ 26 = CBS 1879, Typ 27 = CBS 1892, Typ 28 = ASC 20; Abb. 6), die keinem Cluster zuzuordnen waren. Die 23 Cluster bestanden aus 12 Clustern, die ausschließlich 58 Pigmentbildner beinhalteten (A 1, A 4, A 6-8, A 11-17; Abb. 6) und neun Clustern, die ausnahmslos 38 Nicht-Pigmentbildner enthielten (A 2, A 3, A 5, A 9, A 18-21, A 23; Abb. 6). Zwei Cluster enthielten sowohl Pigmentbildner als auch Nicht-Pigmentbildner, namentlich A 10 mit drei Pigmentbildnern und drei Nicht-Pigmentbildnern und A 22 mit fünf Pigmentbildnern und zwei Nicht-Pigmentbildnern. Weitergehende Clusteranalysen zeigten, dass 113 der 114 Stämme in zehn Clustern zu finden waren, wenn der Dice-Koeffizient auf  $S_{AB} = 0,75$  als rechnerischer Schwellenwert für die Clustererstellung festgelegt wurde (blaue gestrichelte Linie B in Abb. 6). Der verbleibende Stamm ASC 20 konnte keinem der zehn Cluster zugeordnet werden. Wurde der  $S_{AB}$  auf 0,64 als Schwellenwert verkleinert (grüne gestrichelte Linie C in Abb. 6), konnten alle Stämme bis auf ASC 20 vier Clustern zugeordnet werden. Erst bei einem  $S_{AB}$  von 0,62 lag auch ASC 20 innerhalb dieser vier Cluster. Demnach konnte in Abhängigkeit vom Dice-Koeffizienten  $S_{AB}$  die resultierende Anzahl der Cluster von 23 bis vier variiert werden. Die drei *M. pachydermatis*-Stämme ASC 2, ASC 20 und ASC 21, die von Aizawa und Kano (2001) als demselben Typ B zugehörig beschrieben worden waren und somit in besonderer genetischer Nähe zu *M. furfur* stehen sollen, zeigten in den vorgelegten Ergebnissen unterschiedliche Bandenmuster. ASC 2 und ASC 20 hatten einzigartige RAPD-Profile und konnten keinem Cluster zugeordnet werden, während ASC 21 ein gemeinsames Profil mit Cluster A 5 offenbarte, das exklusiv Nichtpigmentbildner beinhaltet.

Auch die Referenzstämme CBS 1879 und CBS 1892 hatten ein einzigartiges Bandenmuster.

Für die amplifizierten Banden wurden Molekulargewichtsgrößen mit Gelcompar 4.0 ermittelt: 13 Bandenbereiche konnten für die Bandenprofile aller getesteten Stämme definiert werden: 2114-1951 bp, 1732 bp, 1624-1428 bp, 1396-1358 bp, 1197-1090 bp, 1083-989 bp, 995-863 bp, 860-751 bp, 734-722 bp, 720-651 bp, 608-531 bp, 494-434 bp und 430-369 bp. Die Bandenbereiche wurden in Abstimmung mit den Ergebnissen der Clusterbildung mit einem Schwellenwert für den Dice-Koeffizienten von  $S_{AB} = 0,96$  festgelegt.

Das größte Cluster (A 4, Abb. 6) enthielt 12 Isolate (11%) mit sechs Banden in den Bandenbereichen: 1624-1428, 1197-1090, 729-651, 608-531, 494-434 und 430-369 bp. Während CBS 1892 und ASC 20 als einzige Stämme zusätzlich eine Bande im Bandenbereich 1396-1358 bp aufwiesen, hatte nur ASC 2 eine Bande bei 1732 bp.



**Abb. 6: Dendrogramm aus 114 *M. pachydermatis*-Stämmen mit dem Primer Rp-Malas-1**

**A:** 23 Cluster (A 1- A 23) mit einem  $S_{AB}$  von 0,96; **B:** 10 Cluster (B 1- B 10) mit  $S_{AB} = 0,75$ ;

**C:** 4 Cluster (C 1- C 4) mit  $S_{AB} = 0,64$

**Orange Balken:** Pigmentbildner; **Gelbe Balken:** Nicht-Pigmentbildner

**Typen 24-28:** ASC 2, 205, CBS 1879, CBS 1892 ASC 20 (Stämme ohne Cluster mit  $S_{AB} = 0,96$ )

**Schwarze Ellipse:** Ähnlichkeit der Nicht-Pigment- (A5) und der Pigmentbildner (A4) bei  $S_{AB} = 0,86$

### 3.4 Gegenüberstellung der physiologisch-biochemischen und genetischen Typen

Die physiologisch-biochemisch gefundenen Typen ( Tab. 13) wiesen bei der Clusteranalyse ( $S_{AB} = 0,96$ , Abb. 6) in der Regel kein charakteristisches genetisches Profil auf.

Lediglich die physiologisch-biochemischen Typen 8, 9 und 10 hatten einheitliche RAPD-Muster (Genotypen 18, 9 und 23; grau unterlegt in Tabelle 11). Während die Genotypen 18 und 9 auch bei anderen physiologisch-biochemischen Typen vorkamen, besaß der physiologisch-biochemische Typ 10, den nur insgesamt 2 Stämme aufwiesen, einheitlich und ausschließlich den Genotypen 23.

**Tabelle 11:** Gegenüberstellung der physiologisch-biochemischen und genetischen Typen

Phys.-bioch. Typen	Stamm	Gen. Typen	Phys.-bioch. Typen	Stamm	Gen. Typen	Phys.-bioch. Typen	Stamm	Gen. Typen
1	7	13	7	48	15	18	144	14
1	21	14	7	56	17	18	149	12
1	46	4	7	78	15	18	178	1
1	101	12	7	115	13	18	223	4
1	104	13	7	133	17	19	141	18
1	106	13	7	155	6	20	1	1
1	110	4	7	162	6	20	4	1
1	128	8	7	165	13	20	38	1
1	143	13	8	52	18	20	43	20
1	145	8	8	96	18	20	59	4
1	148	4	8	173	18	20	62	4
1	152	15	8	181	18	20	72	22
1	164	13	9	31	9	20	105	22
1	212	22	9	151	9	20	109	7
2	91	4	10	119	23	20	112	22
2	136	5	10	183	23	20	121	7
2	140	5	13	ASC2	24	20	153	1
2	147	5	15	13	4	20	191	7
2	167	9	15	14	8	20	203	21
2	220	9	15	30	4	20	207	21
2	226	9	15	87	14	20	209	5
2	ASC21	5	15	92	4	20	CBS1892	27
3	9	5	15	122	11	21	29	19
3	22	5	15	123	16	21	42	18
3	76	9	15	126	11	21	97	19
3	77	9	15	130	14	21	111	22
3	83	9	15	142	4	21	134	8
3	182	5	15	154	11	21	176	20
5	204	3	15	170	10	21	179	22
6	127	3	15	171	10	21	193	18
6	205	25	15	177	11	22	200	2
6	215	3	16	18	5	23	57	8
7	5	4	16	131	6	24	94	16
7	11	8	16	ASC20	28	25	CBS1879	26
7	16	17	17	58	11			
7	20	10	17	82	10			
7	26	22	17	88	2			
7	35	6	17	137	10			
7	39	17	17	163	3			
7	41	17	17	186	10			



### 3.5 Analyse des Pigments

Die exemplarisch gewonnenen Rohextrakte der über den Pigmentierungsversuch (siehe 2.3.1.7) gebildeten Agarverfärbungen unterschieden sich farblich beim starken und schwachen Pigmentbildner ebenso deutlich voneinander wie zuvor die Pigmentbildungen. Aus dem Rohextrakt des *stärksten ermittelten Pigmentbildners mit der Labornummer 178* und des *schwachen Pigmentbildners mit der Labornummer 78* konnte mittels der Gelpermeationschromatographie unter UV-Licht jeweils die gleiche Anzahl an Farbfractionen ermittelt und gewonnenen werden. Aber nur beim starken Pigmentbildner war in allen sieben Fraktionen aufgereinigtes Pigment enthalten. Beim schwachen Pigmentbildner dagegen erhielt man nach Trocknung in einem Rotationsverdampfer ausschließlich in den Fraktionen 2,3,4 und 5 aufgereinigtes Pigment (Abbildung 7).

Die Laufzeit der Säule betrug beim starken Pigmentbildner etwa 4 h und beim schwachen Pigmentbildner etwa 5 h und war damit deutlich länger als bei Verwendung des Rohextraktes von *Malassezia furfur* (etwa 130 min, Mayser und Wille 1998).

Die mittels Dünnschichtchromatographie weiter aufgetrennten einzelnen Pigmentfraktionen offenbarten eine große Anzahl noch unbekannter Farbstoffe und Fluorochrome.

Damit ist der grundlegende Nachweis erbracht, dass auf Nährböden, die Tryptophan als einzige Stickstoffquelle haben, sowohl starke als auch schwache braune Agarverfärbungen von *M. pachydermatis*-Stämmen Pigmente enthalten.

Die weitere Charakterisierung des Pigments erfolgte über die Beschreibung der Farbbanden mit ihren zugehörigen Rf-Werten. Beim starken Pigmentbildner konnten im Tageslicht 59 unterschiedliche Farbbanden mit zugehörigen Rf-Werten gezählt werden (Tabelle 14 im Anhang), beim schwachen Pigmentbildner waren es 47 (Tabelle 15 im Anhang). Bei leichten Unterschieden im Farbton sowie der Intensität und Dicke der Farbbanden waren davon 42 auch in den Fraktionen des starken Pigmentbildners enthalten (Tabellen 14 und 15).

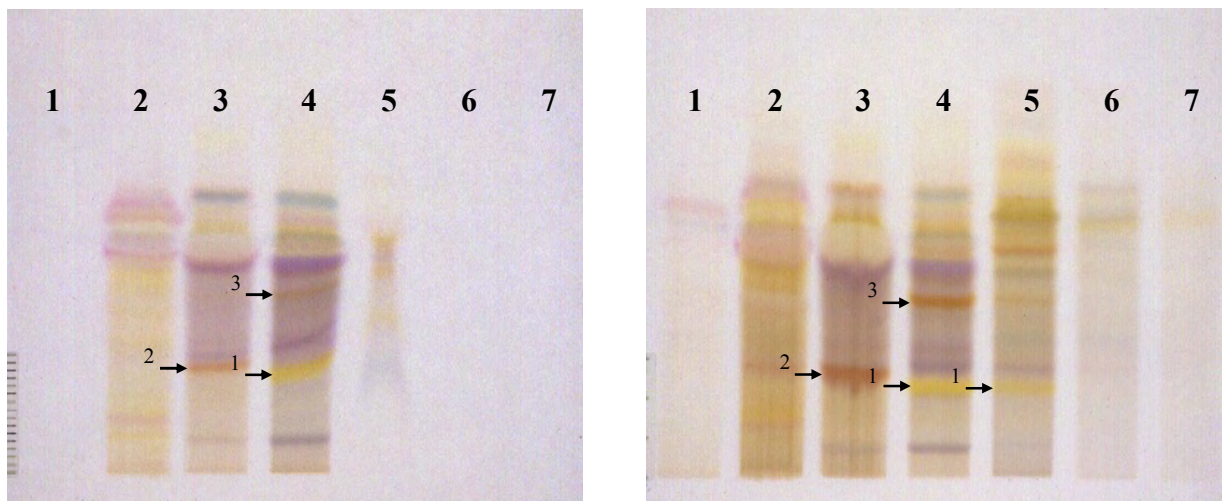
Die beiden verwendeten *M. pachydermatis*-Pigmentbildner hatten Farbbanden, die nach ihren Rf-Werten und ihrer Farbgebung mit Banden der Spezies *M. furfur* übereinstimmten. Der starke Pigmentbildner zeigte 14 (24%) gemeinsame Banden, während der schwache Pigmentbildner darüber hinaus eine mit gemeinsame Bande *M. furfur* aufwies, die der starke nicht hatte (Tab. 14 und 15).

Erst unter UV-Licht wurden fluoreszierende Banden sichtbar, ein Teil konnte den bei Tageslicht sichtbaren Farbbanden zugeordnet werden. Beim starken Pigmentbildner zeichneten sich 35 fluoreszierende Banden ab, beim schwachen Pigmentbildner 25. Ein kleiner Teil stimmte gemäß Rf-Wert und Farbgebung beim starken und schwachen Pigmentbildner mit ebenfalls fluoreszierenden Banden der Spezies *M. furfur* überein (Tab. 14 und 15).

Der UV-Filter Pityriacitrin, der sowohl für *M. furfur* (Mayser 2002) als auch für *M. pachydermatis* (Mayser 2004) nachgewiesen worden war, wurde sowohl beim starken als auch beim schwachen Pigmentbildner anhand der Farbgebung und des Rf-Wertes identifiziert.

Darüber hinaus gibt es gemäß der Farbbanden und der Rf-Werte Anhaltspunkte für einen Nachweis weiterer Stoffe, die bereits im Pigmentstoffwechsel von *M. furfur* gefunden wurden. Pityriarubin A, Pityriarubin B (Irlinger 2004) und das im UV-Licht fluoreszierende Pityrialacton (Mayser 2003) kommen in Betracht (Tab. 14 und 15; Abb. 7).

Interessant wären nachfolgende Untersuchungen zur bestätigenden Analyse.



**Abbildung 7:** Dünnschichtchromatographien von *M. pachydermatis*-Pigmentbildnern  
links: schwacher Pigmentbildner  
rechts: starker Pigmentbildner

1 = Pityriacitrin

2 = Pityriarubin A

3 = Pityriarubin B

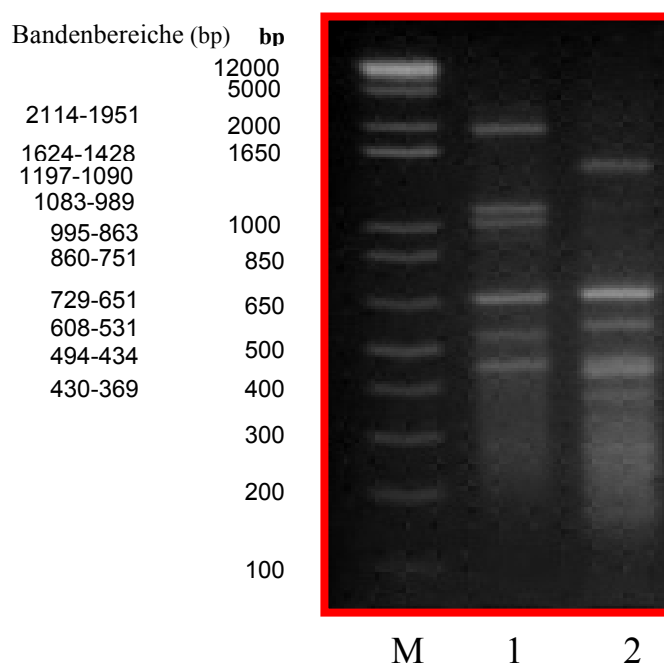
### 3.6 Statistische Voraussage von Pigmentbildung

Die physiologisch-biochemischen Parameter zeigten im logistischen Regressionsmodell keine deutliche Vorhersagequalität für die Pigmentproduktion. Aber im Regressionsmodell für genetische Parameter zeigte sich, dass die vier RAPD-Bandenbereiche 1083-989, 995-863,

860-751 und 430-369 bp statistisch das Auftreten von Pigmentbildung vorhersagen können ( $p < 0,001$ ). Unter der Bedingung fehlender Banden in den Bandenbereichen 1083-989, 995-863, 860-751 bp und bei vorhandener Bande bei 430-369 bp ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Isolat Pigment bildet, 93%. Diese Bandenkonstellation lag bei 30% aller Isolate und bei 44% aller Pigmentbildner vor (Abbildung 10 im Anhang).

Fehlen alle vier genannten Bandenbereiche (wie bei 14% der Isolate und 21% der Pigmentbildner), so beträgt die Wahrscheinlichkeit für einen Pigmentbildner immerhin noch 72%.

Bei Aufnahme der physiologisch-biochemischen Parameter Konsistenz, D-Sorbitol- und D-Mannitolverstoffwechslung in eine logistische Regression zeigten sich nur für die Konsistenz ( $p = 0,0666$ ) und die D-Mannitolverstoffwechslung ( $p = 0,1168$ ) Hinweise auf eine Vorhersagequalität für Pigmentbildner. Der höchste Wahrscheinlichkeitswert ergab sich bei Nichtvorliegen dieser drei Merkmale (wie bei 32% aller Isolate). Hier ist die Wahrscheinlichkeit allerdings für einen *Nicht*-Pigmentbildner 74% (Abb. 9 im Anhang).



**Abb. 8: RAPD Profile eines *M. Pachydermatis*-Pigmentbildners und eines -Nicht-Pigmentbildners**  
 Pigmentbildner zeichnen sich durch fehlende Banden in den Bandenbereichen 1083-989, 995-863, 860-751 bp und eine vorhandene Bande im Bandenbereich 430-369 bp aus.

**M:** Kb+ Marker; **Spalte 1:** Nicht-Pigmentbildner, Stamm 173; **Spalte 2:** Pigmentbildner, Stamm 30

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die nähere physiologisch-biochemische sowie genetische Charakterisierung der Spezies *M. pachydermatis* unter besonderer Berücksichtigung einer pigmentbildenden Subgruppe. Letztere wurde zum ersten Mal näher beschrieben. Hierzu wurden sowohl physiologisch-biochemische als auch molekulargenetische Daten an einem umfangreichen Bestand von 210 Stämmen erhoben. 205 einheimische Wildstämme, die Referenzstämme der Spezies *M. pachydermatis* CBS 1879 und 1892 und drei von Aizawa und Kano zur Verfügung gestellte Stämme ihres Typs B (ASC 2, 20, 21) wurden untersucht.

25 verschiedene physiologisch-biochemische Profile ließen sich differenzieren (Tabelle 13 im Anhang). Sie beruhen auf Ergebnissen bei der Assimilation von *D-Glukose* (100%), Glycerol (99%), *D-Mannitol* (46%), *D-Sorbitol* (41%), *Succinat* (2%) sowie bei der Catalase-,  $\beta$ -Glukosidase-Aktivität, bei der Kulturmorphologie und der Tryptophan-abhängigen Synthese von Pigmenten. Letztere wurde zum ersten Mal in ein physiologisch-biochemisches Profil von *M. pachydermatis* aufgenommen.

Das am häufigsten ermittelte physiologisch-biochemische Profil besaß eine wässrige Konsistenz, *D-Glukose*- und *Glycerol*-Assimilation und eine weiße Ringbildung auf P-Agar. 32 Stämme (15%) wiesen es auf (Typ 3, Tabelle 13). Neun Stämme zeigten einzigartige Resultate darunter ASC 2 und CBS 1879. Die pigmentbildende Subgruppe ließ sich physiologisch-biochemisch in acht Typen differenzieren (Tabelle 13).

Kiss (1996) unterschied biochemisch bei der Erforschung von 80 *M. pachydermatis*-Stämmen sowie dem Referenzstamm CBS 1879 anhand unterschiedlicher Eigenschaften bei der Assimilation von *D-Mannitol*, *D-Sorbitol* und Nikotinsäure sowie der Hydrolyse von Tween 80 zwei Gruppen. Die erste Gruppe (47%) unterschied sich von der zweiten (53%) durch die fehlende Eigenschaft, *D-Mannitol*, *D-Sorbitol* und Nikotinsäure zu assimilieren und Tween 80 zu hydrolysieren. Kiss verzichtete dabei auf eine Zusammenfassung der biochemischen Leistungen der getesteten Stämme mit der Kulturkonsistenz bzw. der Zellmorphologie.

Weitere physiologisch-biochemische Beschreibungen der Heterogenität von *M. pachydermatis* in der Literatur beschränken sich auf die Feststellung unterschiedlicher Stoffwechseleigenschaften innerhalb der Spezies ohne konkrete Vorschläge, sie physiologisch-biochemisch zu unterteilen und eventuell taxonomisch neu zu definieren. Es gilt bis heute, dass alle *Malassezia*-Isolate, die auf Medien ohne Lipidzugabe wachsen, der

heterogenen, nicht lipiddependenten Spezies *M. pachydermatis* zuzuordnen sind (Slooff 1970).

Tabelle 12 zeigt die in der jetzigen Untersuchung vorgelegten physiologisch-biochemischen Ergebnisse im Zusammenhang mit bisher publizierten Daten.

**Tabelle 12:** Kohlenhydrat- und Tween-Assimilationsergebnisse (Angaben in %)

	MAN	SOR	SRE	SUC	LAT	LAC	GLY	GLU	SBE	Tw20	Tw40	Tw60	Tw80
Present study	46	41	0	2	0	0	99	100	0	4	100	100	100
Slooff (1970)	100	100	-	v.E.	v.E.	0	v.E.	100	-	-	-	-	-
Sanguinetti (1984)	100	-	4	0	0	0	-	100	-	-	-	-	-
Kiss (1996)	53	50	0	-	-	0	-	100	-	100	100	100	53

\*MAN= *D-Mannitol*, SOR= *D-Sorbitol*, SRE= *Saccharose*, SUC= *Succinat*, LAT= *Laktat*, LAC= *Lactose*,

GLY= *Glycerol*, GLU= *D-Glukose*, SBE= *L-Sorbose*

\*\*Tw20,40,60,80= Tween 20,40,60,80

\*\*\*v.E.= variable Ergebnisse

Slooff (1970) berichtete über eine ausnahmslose Assimilation von *D-Mannitol* (MAN) und *D-Sorbitol* (SOR). Sanguinetti (1984) bestätigte diese Ergebnisse für 120 getestete Isolate. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für *D-Mannitol* (46%) und *D-Sorbitol* (41%) liegen im Bereich von Kiss (1996). Sanguinetti schilderte eine seltene Assimilation von *Saccharose* (SRE; 4%), die bisher kein Autor beschrieben hatte und keine Assimilation von *Succinat* (SUC) und *Laktat* (LAT). Slooff berichtete für letztere variable Ergebnisse. In der jetzigen Untersuchung war das Ergebnis für *Saccharose* negativ, wie auch von Kiss beschrieben. *Saccharose* schien ausschließlich verstoffwechselt, wenn eine Verunreinigung mit *Candida*-Hefen vorlag; letztere konnte mikroskopisch nachgewiesen werden.

Außerdem wurden wenig *Succinat*-positive (2%) und fragliche Resultate für *Laktat* gefunden. Auch für *Lactose* (LAC) war das Ergebnis in Übereinstimmung mit der Literatur negativ (Slooff 1970, Sanguinetti 1984, Kiss 1996). *Glycerol* (GLY) wurde zu 99% metabolisiert, was dafür spricht, dass im Gegensatz zu den obligat lipophilen *Malassezia*-Spezies nicht unbedingt Fettsäuren (Huang 1993) und Triglyceride für das Wachstum vorhanden sein müssen. Für *M. pachydermatis* scheint der dreiwertige Alkohol *Glycerol* allein auszureichen, um ein mit *Glukose*-Zugabe (GLU) vergleichbares gutes Wachstum zu generieren. Slooff schilderte für *Glycerol* variable Resultate. Das Wachstumsverhalten mit *L-Sorbose* (SBE) wurde jetzt zum ersten Mal beschrieben. Es war immer negativ.

Unterschiedliche Ergebnisse der Autoren für die Kohlenhydratassimilation könnten durch verschiedene Nährmedien entstanden sein. Beispielsweise testete Sanguinetti mit der Auxanogramm-Methode nach Ajello (1963) auf Blutagar, dem die Substrate inkorporiert wurden. In der vorgelegten Studie wurde dagegen gemäß Kiss (1996) nach Barnett (1990) ein Medium auf Nitrogen-Basis für das Auxanogramm verwendet. Die Substrate wurden dem Medium aufgetropft, nachdem die Pilzzellen inkorporiert worden waren. Zudem kann eine fakultative Verstoffwechslung von Substraten ein Grund für abweichende Ergebnisse in der Literatur sein.

Bei wiederholter Messung zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit die Eigenschaft, *D-Mannitol*, *D-Sorbitol* und *Succinat* zu verstoffwechseln, inkonstant (bei 5%, 20% bzw. 43% fehlte das Assimilationsmerkmal). Demnach könnten *D-Mannitol*, *D-Sorbitol* und *Succinat* von einigen Isolaten fakultativ verstoffwechselt werden. Auch Slooff (1970) berichtete für *Succinat* von variablen Ergebnissen. Zudem konnte sie als bisher einzige die Assimilation von *Laktat* beschreiben. Bei *Laktat* war im Rahmen der aktuellen Untersuchungen oft ein sehr schwacher, diffuser Ansatz von Wachstum zu erkennen, der wegen mangelnder Intensität nicht als Wachstum gewertet wurde.

Die Substrate wurden in einem Volumen aufgetropft, das einen Einfluss auf das Wachstum beim Nachbarsubstrat verhindern sollte. In Vorversuchen wurde klar, dass ein solcher Einfluss besonders von *D-Glukose* und *Glycerol* ausging, bei denen meist ein starkes Wachstum entstand. Dieses konnte beim Nachbarsubstrat sowohl Wachstum generieren als auch hemmen. Für sieben Stämme kann angenommen werden, dass ein Wachstum mit Glukose behindert wurde, da sie wiederholt für die Positivkontrolle Glukose kein Wachstumsergebnis zeigten, auf Selektivagar für pathogene Pilze (SPF) aber wuchsen. Ein zweiter möglicher Grund mag ein zu geringes Glukoseangebot gewesen sein.

Für den Referenzstamm der Spezies *M. pachydermatis* CBS 1879 wurden die Ergebnisse von Kiss (1996) bestätigt (Assimilation von *D-Glukose*, *D-Mannitol* und *D-Sorbitol*). Jedoch wurde für CBS 1879 zusätzlich eine *Succinat*-, aber bemerkenswerter Weise keine *Glycerol*-Assimilation nachgewiesen. Letztere wurde nur bei insgesamt zwei Stämmen negativ getestet. Der zweite Referenzstamm CBS 1892 metabolisierte neben *D-Glukose*, *D-Mannitol* und *D-Sorbitol* zusätzlich *Glycerol*.

Für die getesteten 210 Stämme ergeben sich beim Kohlenhydratauxanogrammtest hauptsächlich drei verschiedene Assimilationsprofile (96%): zum einen *D-Glukose* zusammen mit *Glycerol*, zweitens *D-Glukose*, *Glycerol* und *D-Mannitol* sowie drittens *D-Glukose*,

*Glycerol*, *D-Sorbitol* und *D-Mannitol* (Tabelle 9). Eine ausschließliche Bewertung der Ergebnisse der Kohlenhydratauxanogramme legt eine Unterteilung der Spezies in drei Gruppen nahe. Die Tweenassimilation erwies sich dagegen anders als bei Kiss (1996) als wenig trennende Methode.

Die Esteraseaktivität für Tween 40 und 60 entsprach der gemäß Kiss. Unterschiede gegenüber Kiss ergaben sich in der Beurteilung der Esteraseaktivität für Tween 20 (Polyoxysorbitanmonolaurat) mit 4% und Tween 80 mit 100%. Kiss beschrieb sie mit 100% bzw. mit 51%. Guillot hatte 1996 Ergebnisse veröffentlicht, wonach die Tweenesterase bei *M. pachydermatis* sowohl für Tween 20 als auch für Tween 80 unterschiedlich ist.

Die Ergebnisse dieser Studie für Cremophor EL erweitern die von Mayser und Haze (1997) gewonnenen Resultate, welche die Cremophor-Assimilation als Indikativ für *M. furfur* auswiesen. Den vorliegenden Ergebnissen ist zu entnehmen, dass Cremophor vom überwiegenden Teil der getesteten *M. pachydermatis*-Isolate assimiliert wurde. Eine Assimilation von Cremophor wurde nicht nur bei Pigmentbildnern, die biochemisch in Nähe zur pigmentbildenden Spezies *M. furfur* gesehen werden, beobachtet, sondern auch bei Nicht-Pigmentbildnern und weißen Ring-Bildnern (siehe Tabelle 13).

Die Catalase-Aktivität ist schon von anderen Autoren beschrieben worden (Guillot 1999). Bekannt ist bisher, dass *M. restricta* als einzige *Malassezia*-Spezies keine Catalase-Aktivität zeigt (Guillot und Guého 1996).

Die  $\beta$ -Glukosidase-Aktivität mittels Eskulin-Agar hatten Mayser und Haze 1997 zur Verbesserung der Differenzierung von *M. furfur*, *M. slooffiae* und *M. sympodialis* getestet. Den aktuellen Experimenten zu Folge war der Nachweis für alle *M. pachydermatis*-Isolate positiv.

Auf fettfreiem, glukosehaltigem Selektivagar für pathogene Pilze (SPF, siehe 2.2 Kulturmedien) haben die Kolonien, wie u.a. bei Guillot 1999 beschrieben, ein mattes, blasses, weiß-gelbliches Aussehen. Die Oberfläche ist trocken und glatt. Mit zunehmendem Alter wird der Farbton dunkler, Richtung goldbraun. Kiss unterschied 1996 bei 81 Stämmen kulturmorphologisch zwei Formen: einerseits weiß-cremefarbene, feuchte Kolonien (43%), andererseits dunkel-cremefarbene, trockene (schwer zu suspendierende) Kolonien (57%, inklusive CBS 1879). In dieser Arbeit konnten zwei verschiedene Typen nach ihrer Kulturkonsistenz unterschieden werden. Der Ausstrich von Typ 1 war ein wässriger Film (58%), der des Typs 2 war deutlich trockener bis bröckelig (42%). Beide Referenzstämme waren trocken (Tabelle 13). Die Farbe der Kulturen schien eher ihr Alter als ihre Konsistenz

anzuzeigen. Anders als bei Kiss (1996) wurde auch die Kulturkonsistenz in das physiologisch-biochemische Profil der Stämme aufgenommen (Tabelle 13).

In der Vergangenheit konnte festgestellt werden, dass unter den bekannten Spezies der Gattung *Malassezia* neben *M. furfur* auch ein Teil der untersuchten *M. pachydermatis*-Stämme auf einem Nährmedium, das nur aus der Aminosäure Tryptophan (TRP) und einer Lipidquelle besteht, ein braunes in den Agar diffundierendes Pigment bilden kann. Dieses Pigment fluoresziert im UV-Licht (Mayser und Wille 1998). Die Pigmentbildung ist nur möglich, wenn TRP als Stickstoffquelle vorhanden ist; die Lipidquelle ist dagegen variierbar.

Mayser und Thöws verwendeten 2004 als Testmedium für *M. pachydermatis* einen Glukosehaltigen P-Agar, wobei im Gegensatz zu *M. furfur* eine Pigmentbildung erst nach deutlich längerer Inkubationszeit und mit geringerer Ausbeute auftrat.

Auch in der vorliegenden Untersuchung stellte sich für den Pigmentierungstest der P-Agar als das beste Screeningsmedium heraus (siehe 2.3.1.7). Unter Variation der TRP- und Glukose-Zugabe wurde ein Verhältnis verwendet, das eine gute Identifikation und Abgrenzung von starken, schwachen und Nicht-Pigmentbildnern zuließ (siehe 2.3.1.7).

Bei 210 getesteten Stämmen wurden innerhalb der lipophilen Spezies *M. pachydermatis* 40% Pigmentbildner festgestellt. Quantitative Pigmentunterschiede (ca. 18% starke und 22% schwache Pigmentbildner) waren in den Subkulturen nicht immer konstant. Mayser und Thöws hatten 2004 11% *M. pachydermatis*-Pigmentbildner darstellen können. Die unterschiedlichen Ergebnisse erklären sich durch eine 3,3-fache Erhöhung der TRP-Zugabe im P-Agar, die auch schwache Pigmentbildungen sichtbar werden ließ. Zudem bot die aktuell vorgestellte Methode mit Suspensionstropfen auf dem P-Agar eine bessere Differenzierungsmöglichkeit gegenüber Nichtpigmentbildnern als die des einfachen Ausstrichs.

Zum ersten Mal konnte beim Test mit P-Agar die Formation eines weißen Ringes unter den Nicht-Pigmentbildnern beschrieben werden. Indessen war bei Verwendung von P-Agar ohne Glukosezugabe ein weißer Ring das mit Abstand häufigste Ergebnis (79%). Des Weiteren legen die Ergebnisse für P-Agar ohne Glukose nahe, dass für *M. pachydermatis* neben Lipiden (Mayser 2004) auch Glukose eine Voraussetzung für Pigmentbildung ist. Zur Klärung, ob bei letzterem schwache Pigmentbildungen vorlagen, müssten diese weiter analysiert werden (wie unter 2.4 beschrieben).

Über die exemplarische Gewinnung des Pigments eines starken und eines schwachen Pigmentbildners als Rohextrakt, unter Aufreinigung durch Säulenchromatographie und



Auftrennung des Pigments mittels Dünnschichtchromatographie konnte sowohl für eine starke als auch für eine schwache *M. pachydermatis*-Pigmentbildung auf P-Agar der Nachweis erbracht werden, dass es sich wie bei *M. furfur* um definierte Substanzen handelt. Dieses besteht ebenfalls aus einer großen Anzahl bisher unbekannter Farbstoffe und Fluorochrome. Der starke und der schwache Pigmentbildner hatten den größten Teil ihrer Farbbanden gemeinsam. Ein Teil der Farbbanden des starken und schwachen Pigmentbildners waren auch im Bandenspektrum vom *M. furfur*-Referenzstamm zu erkennen. Auch in den fluoreszierenden Banden bestanden Gemeinsamkeiten. Dünnschichtchromatographische Ergebnisse deuten anhand von entsprechenden Rf-Werten und Farbgebungen darauf hin, dass neben dem UV-Filter Pityriacitrin (Mayser 2004) weitere im Pigment von *M. furfur* nachgewiesene Bestandteile wie Pityriarubine (Irlinger 2004) oder Pityrialacton (Mayser 2003) auch im Pigment von *M. pachydermatis* enthalten sein können (Tab. 14 und 15; Abb.7). Diese Pigmentbestandteile zeigen neben UV-Filtereffekten (Mayser 2002) bestimmte pharmakologische Eigenschaften wie die Hemmung des „respiratory burst“ in humanen Neutrophilen (Krämer und Kessler 2005) und die Induktion von Apoptosen bei humanen Melanozyten (Krämer und Podobinska 2005). Sie kommen als Pathogenitätsfaktoren in Frage. Weiterführende genauere Substanzeanalysen sind geplant.

Während Phänomene wie die Nicht-Pigmentbildung oder die erstmals beschriebene weiße Ring-Bildung bei *M. furfur* nicht beobachtet werden können, ist besonders die Gruppe der Pigmentbildner der Spezies *M. pachydermatis* hinsichtlich einer möglichen phylogenetischen und taxonomischen Nähe zu *M. furfur* von Interesse. Könnte beispielsweise *M. furfur* aus *M. pachydermatis* im Rahmen einer Differenzierung hervorgegangen sein? Könnte sich dabei *M. furfur* durch Steigerung seiner Lipophilie zur Lipiddependenz unter Bewahrung des TRP-abhängigen Stoffwechselwegs weiter spezialisiert haben?

Beschreibungen in der Literatur von Stämmen innerhalb der Spezies *M. pachydermatis* mit erhöhtem Lipidbedarf (Senczek 1999, Duarte 2002) können in dieser Arbeit bestätigt werden. 15 Stämme von ursprünglich 227 einheimischen Wildstämmen wuchsen nur spärlich auf lipidfreiem, glukosehaltigem SPF, deutlich besser jedoch bei Lipidzugabe. Mit der Methode der ribosomal large subunit (LSU) Sequenzierung konnte Guillot 1997 diese atypischen Isolate zu einer genetisch eigenständigen Gruppe zusammenfassen.

Die physiologisch-biochemischen Ergebnisse zusammenfassend, sind Instabilitäten auffällig. Es scheinen gewisse Variabilitäten im Testverhalten der *M. pachydermatis*-Stämme die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse herabzusetzen. Beispiele dafür sind der Pigmenttest mit

92% Ergebnisstabilität, der Konsistenztest mit 90% und das Kohlenhydratauxanogramm mit 84%. Bei letzterem tritt besonders die instabile Eigenschaft der D-Sorbitolassimilation hervor. Zweifelsohne ist als Grund in diesem Zusammenhang auch eine Subjektivität bei der Testauswertung anzuführen.

Nur die wenig trennende Methode der Lipidassimilation bzw. die nicht trennenden Methoden der Catalase- und  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität wiesen bei wiederholtem Testen zu 100% stabile Ergebnisse auf.

In den letzten Jahren sind genetische Analysetechniken in den Vordergrund gerückt, die die Hoffnung auf eine valide Taxonomie bergen, mit der Perspektive auf eine einfache, schnell durchzuführende und zuverlässige Routinediagnostik (Guillot 1999). Es zeigte sich jedoch, dass auch mit diesen Methoden *Malassezia*-Spezies eine hohe Varianz aufweisen. Ursachen und Bedeutung dieser Variabilität sind bisher noch nicht genau abgeklärt. (Guillot 1999).

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) Analyse wurde in der vorgelegten Arbeit für die molekulare Differenzierung von *M. pachydermatis*-Isolaten verwendet, da sie einfach und robust ist und eine zuverlässige Differenzierungsmethode in epidemiologischen Untersuchungen bei Hefen darstellt (Hossain 2003). Zudem deckt sie feine Unterschiede zwischen den Isolaten auf (Trevino-Castellano 2003).

Mit dem Primer Rp-Malas-1 (FM-1), der in Vorversuchen im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Giessen unter vier untersuchten Primern den größten diskriminatorischen Index aufwies, konnten unter 114 Isolaten 28 Genotypen unterschieden werden. Die Wahl des Dice-Koeffizienten ( $S_{AB}$ ), der über Gleichheit der genetischen Profile entscheidet, war ausschlaggebend für die Anzahl der Cluster. Sie differierte je nach Größe des  $S_{AB}$  zwischen vier und 23 (gestrichelte Linien A, B, C; Abb. 6). Aizawa und Kano (2001) differenzierten dagegen mit demselben Primer vier RAPD Profile (Typ A, B, C und D) in 110 *M. pachydermatis*-Isolaten. Zudem beschrieb Castella (2005) kürzlich als Ergebnis ihrer RAPD-Untersuchungen mit einem anderen Primer unter 55 Isolaten ebenfalls vier Genotypen.

Diese Ergebnisse kann die vorliegende Arbeit nicht bestätigen. Vier Cluster stellten sich nur dar, wenn ein niedriger Dice-Koeffizient  $S_{AB} = 0,62$  verwendet wurde. Da dieser niedrige  $S_{AB}$  den individuellen Bandenmustern (Abb. 6) der einzelnen Stämme jedoch nicht gerecht wurde, wurde den Untersuchungen vorrangig ein hoher  $S_{AB}$  von 0,96 zu Grunde gelegt, der 28 RAPD Profile identifizierte. Diese in hohem Maße gefundene Heterogenität unter Isolaten der Spezies *M. pachydermatis* bekräftigt eine Beschreibung Kurtzmanns (1994), wonach die

Nukleotid-Substitution im Genus zwischen den *Malassezia* spp. eine hohe Rate aufweist. Die Nukleotid-Substitution übersteigt bei weitem die Werte anderer Hefe-Genera und nährt die Hypothese einer schnellen „molecular clock“ mit dem Ergebnis eines enormen Polymorphismus im Genus (Kurtzmann 1994). Dieser enorme Polymorphismus könnte indessen auch zur Überbewertung von phylogenetischen Distanzen auf Forscherseite führen (Guillot und Guého 1995).

Aizawa und Kano (2001) hatten zudem für *M. pachydermatis*-Isolate des RAPD-Typs B eine besondere genetische Nähe zu *M. furfur* beschrieben, die ausgeprägter sei als die zum *M. pachydermatis*-Referenzstamm CBS 1879. Auch Makimura hatte 2000 von einer Untergruppe mit einer solchen Nähe zu *M. furfur* berichtet. In der aktuellen Studie wurde untersucht, ob die pigmentbildende Subgruppe dem Typ B zugeordnet werden könne, um damit den Nachweis einer besonderen genetischen Nähe zu *M. furfur* auf der Grundlage der gemeinsamen biochemischen Eigenschaft der Pigmentbildung (Mayser 2004) zu erbringen. Drei Stämme ihres Typs B (ASC 2, ASC 20, ASC 21) wurden freundlicherweise durch Aizawa und Kano zur Verfügung gestellt und in die vorliegende Studie integriert. ASC 2, ASC 20 und ASC 21 zeigten jeweils keine Pigmentbildung, darüber hinaus wiesen sie in den vorgelegten Untersuchungen heterogene RAPD-Profile auf. ASC 2 und ASC 20 hatten einzigartige RAPD-Profile, sie konnten keinem Cluster zugeordnet werden. ASC 21 offenbarte ein gemeinsames Profil mit Cluster A5, das exklusiv Nichtpigmentbildner beinhaltet (Abb. 6). Es kann angenommen werden, dass Stämme in Cluster A 5 identisch sind mit Typ B.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass kein pigmentbildender Stamm Typ B zugeordnet werden konnte und somit der Nachweis einer besonderen genetischen Nähe der pigmentbildenden Subgruppe zu *M. furfur* mit dieser Methode und diesem Primer nicht erbracht werden konnte. Bemerkenswert ist, dass das Cluster A 5 (das ASC 21 enthält) genetisch besonders Cluster A 4, das ausschließlich Pigmentbildner enthält, nahe steht ( $S_{AB} = 0,86$ ; schwarze Ellipse in Abb. 6). Eine genetische Verwandtschaft der pigmentbildenden Subgruppe der Spezies *M. pachydermatis* mit *M. furfur* kann weiter angenommen werden. Zudem könnte die pigmentbildende Subgruppe eine eigenständige Spezies darstellen.

Genetisch konnte der beträchtliche biochemische Unterschied der Referenzstämme CBS 1879 und CBS 1892 bestätigt werden. Sie wiesen jeweils ein einzigartiges Bandenprofil auf. Dagegen teilte CBS 1879 sowohl nach Aizawa und Kano (2001) als auch nach Castella (2005) das Bandenmuster mit dem überwiegenden Teil ihrer untersuchten Stämme.

Gründe für diese voneinander abweichenden Ergebnisse könnten technischer Art sein oder in der ausgeprägten Heterogenität der Spezies liegen. So beschrieb Chryssanthou (2001) bereits bei sechs untersuchten *M. pachydermatis*-Blutisolaten sechs unterschiedliche RAPD-Bandenmuster. Als Schwachpunkt der RAPD-Methode wurde ihre mangelnde Reproduzierbarkeit angegeben (Guarro 1999), da sie eine sensitive Methode darstellt, in der leichte Veränderungen in Vorbereitung und Durchführung zu Unterschieden in den Bandenmustern führen können. Der Primer Rp-Malas-1, die Annealing- und die Extensionsbedingungen waren in Aizawas und Kanos Studie und in der vorliegenden Studie identisch. Jedoch berichtete Meunier (1993) von unterschiedlichen RAPD-Profilen bei der Verwendung von Taq-Polymerasen unterschiedlicher Hersteller. Zudem wurden im Sinne einer höheren Standardisierbarkeit in der aktuellen Arbeit ein DNA Mini Kit sowie Ready-To-Go RAPD Analysis Beads, die die DNA-Proben temperaturstabil hielten, angewandt. Außerdem wurde die gesamte RAPD in ein und demselben Thermocycler durchgeführt, was eine höhere Reproduzierbarkeit durch Minimierung der Pipettierschritte und Gewährleistung von stabilen Temperaturen ermöglichte. Der Einsatz mehrerer oder verschiedener Thermocycler kann laut MacPherson (1993) Unterschiede in RAPD-Bandenmustern zur Folge haben. Darüber hinaus wurden sowohl im Gegensatz zu Aizawa und Kano (2001) als auch zu Castella (2005) Dice-Koeffizienten berechnet, die eine objektive Bewertung von unterschiedlichen Bandenmustern zulassen und eine zuverlässige Auswertung ermöglichen.

Ferner sind die Ergebnisse Castellas angesichts der Tatsache, dass ihre getesteten 55 Isolate nur 11 Tieren entstammten, zu relativieren. Die in der aktuellen Studie verwendete Sammlung an Wildisolaten wurde im Laufe mehrerer Jahre von unterschiedlichen Tieren zusammengetragen.

Trotz der hohen Heterogenität innerhalb der 114 Isolate konnten 12 Cluster identifiziert werden, die ausnahmslos Pigmentbildner beinhalteten und neun Cluster, die ausnahmslos Nicht-Pigmentbildner enthielten, während zwei Cluster sowohl Pigmentbildner als auch Nicht-Pigmentbildner enthielten. Damit wird zum ersten Mal eine genetische Variabilität unter pigmentbildenden *M. pachydermatis*-Stämmen beschrieben.

Da die Clusteranalyse keine spezifischen RAPD-Bandenmuster für Pigmentbildner ergab, wurde ein statistisches Modell angewandt, um Charakteristika für Pigmentbildner auf der Ebene einzelner definierter Bandenbereiche zu finden. Es wurden sowohl einzelne Bandenbereiche als auch physiologisch-biochemische Merkmale als Parameter in multivariate logistische Regressionsmodelle eingesetzt.

Es war nicht möglich, Pigmentbildung mit physiologisch-biochemischen Parametern vorauszusagen. Jedoch bei Verwendung der vier definierten RAPD-Bandenbereiche 1083-989, 995-863, 860-751 und 430-369 bp als genetische Parameter lässt sich das Auftreten von Pigmentbildung ( $p < 0,001$ ) vorhersagen. Unter der Bedingung fehlender Banden in den Bandenbereichen 1083-989, 995-863, 860-751 bp und gleichzeitig vorhandener Bande bei 430-369 bp ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Isolat Pigment bildet, 93%.

Diese Ergebnisse beruhen auf einer explorativen Datenanalyse und sind damit Stichproben bezogen. Es sollten nun konfirmatorische Datenanalysen folgen, die eine Übertragung auf die Grundgesamtheit erlauben. Erst bei einer solchen Übertragung auf die Grundgesamtheit ist der geschützte Ausdruck „statistisch signifikant“ zulässig.

Diese statistischen Ergebnisse machen deutlich, dass die RAPD-Methode in Verbindung mit einem geeigneten Primer und einem geeigneten statistischen Modell die Vorhersage einer Stoffwechseleigenschaft, hier der Pigmentbildung, erlauben.

Darüber hinaus können diese Ergebnisse großen Einfluss auf die Routinediagnostik zur Identifizierung von pigmentbildenden *Malassezia* Spezies haben. Während die Resultate des Pigmenttests auf TRP-haltigem Nährmedium für *M. pachydermatis* erst nach zwei Wochen vorliegen, liefert sie die RAPD-Methode bereits nach wenigen Stunden. Damit ist die RAPD-Methode interessant im Hinblick auf einen klinischen Test zur schnellen Ermittlung von Pigmentbildnern, zumal Pigmentbestandteile als Pathogenitätsfaktor bei *Malassezia* assoziierten Erkrankungen in Frage kommen (Irlinger 2004, Mayser 2004, Krämer und Podobinska 2005, Krämer und Kessler 2005). Die Kultivierung auf P-Agar ist dagegen zuverlässiger, preiswerter und in jedem Labor durchführbar.

Auffällig ist die sowohl physiologisch-biochemisch als auch genetisch große Heterogenität innerhalb der Spezies *M. pachydermatis*. Darüber hinaus weisen die physiologisch-biochemisch gefundenen Typen bei der RAPD Analyse mit dem Primer Rp-Malas-1 keine charakteristischen genetischen Profile auf (Tabelle 11). Der Referenzstamm CBS 1879 hat sowohl physiologisch-biochemisch als auch genetisch ein einzigartiges Profil. CBS 1892 zeigte genetisch ein einzigartiges und physiologisch-biochemisch ein gemeinsames Profil mit Typ 20 (Abb. 6 und Tabelle13).

Auch Pigmentbildner sind sowohl physiologisch-biochemisch als auch genetisch mit der Methode der RAPD und dem Primer Rp-Malas-1 heterogen.

Scheinbar lassen sich mit zunehmender Anzahl an Tests, die einem physiologisch-biochemischen Profil zugrunde liegen, immer feinere Unterschiede zwischen den Stämmen aufdecken, die sich in einer steigenden Anzahl an differenzierbaren Typen ausdrücken.

Auch die genetisch mit RAPD gefundene Heterogenität könnte auf diesen feinen Unterschieden (Trevino-Castellano 2003) bzw. einem großen Polymorphismus im Genus (Kurtzmann 1994) beruhen.

Bemerkenswert ist, dass das Ausmaß der beschriebenen Heterogenität angesichts vier definierter Bandenbereiche, die Pigmentbildung statistisch vorhersagen ( $p < 0,001$ ), relativiert wird.

## 5 Zusammenfassung

Um Einblicke in Untergruppen der heterogenen Spezies *Malassezia pachydermatis* zu gewinnen, wurden 205 von einheimischen Tieren stammende Wildisolate, die Referenzstämme CBS 1879 und 1892 und drei von Aizawa und Kano zur Verfügung gestellte Stämme des Typs B (2001) physiologisch-biochemisch und genetisch getestet. Im einzelnen wurde die Kulturmorphologie, die Catalase- und  $\beta$ -Glukosidase-Aktivität, die Lipidassimilation (Tween 20, 40, 60, 80; Cremophor EL) und Kohlenhydratassimilation von neun Zuckern, Zuckeralkoholen und Säuren (Laktat, Saccharose, D-Glukose, L-Sorbose, Glycerol, D-Sorbitol, Succinat, D-Mannitol, Lactose) untersucht. An 114 Isolaten wurde die genetische Variabilität mittels RAPD (random amplified polymorphic DNA, Primer Rp-Malas-1) geprüft. Ferner wurde die insbesondere bei *Malassezia furfur* zu beobachtende Tryptophan-abhängige Synthese von Pigmenten und Fluorochromen (Mayser und Wille 1998) mit dem Ziel getestet, die pigmentbildende *M. pachydermatis*-Subgruppe (Mayser 2004) erstmalig physiologisch-biochemisch und genetisch näher zu charakterisieren.

Einige Stoffe dieser Pigmente und Fluorochrome konnten bereits identifiziert werden (Mayser 2003, Irlinger 2005) und kommen als Pathogenitätsfaktoren bei *Malassezia* assoziierten Erkrankungen wie der Pityriasis versicolor in Frage (Krämer und Podobinska 2005, Krämer und Kessler 2005).

Exemplarisch wurden Intensitätsunterschiede des gebildeten Pigments mittels Säulen- und Dünnschichtchromatographie (Mayser und Wille 1998) untersucht und die Ergebnisse in einen Zusammenhang mit der Pigmentbildung von *M. furfur* gestellt.

Im Hinblick auf eine schnelle und zuverlässige Routinediagnostik zur Identifizierung von Pigmentbildnern wurde geprüft, ob Pigmentbildner ein charakteristisches insbesondere genetisches Profil aufweisen. Ein multivariates logistisches Regressionsmodell wurde angewandt, um Pigmentbildung anhand von physiologisch-biochemischen bzw. genetischen Parametern statistisch vorauszusagen.

Zudem wurde die Frage beantwortet, ob *M. pachydermatis*-Pigmentbildner genetisch Typ B nach Aizawa und Kano zuzuordnen sind. Letztere hatten mittels RAPD und Sequenzierung des Chitin Synthase 2 (CHS 2) Gens diese genetisch *M. furfur* besonders nahe stehende Subgruppe gefunden. Die RAPD wurde nach der Methode von Aizawa und Kano (2001) durchgeführt.

Alle getesteten Stämme waren Catalase und  $\beta$ -Glukosidase aktiv. D-Glukose wurde wie Tween 40, 60 und 80 immer assimiliert, Glycerol, D-Mannitol, D-Sorbitol, Succinat, Tween 20 und Cremophor different (99; 46; 41; 2; 4; 66%). Neben Pigmentbildnern unterschiedlicher Intensität wurden Stämme ohne Pigment und unter letzteren Stämme mit weißer Ringbildung gefunden (40; 60; 42%). Die vergleichende Pigmentanalyse ergab eine große Ähnlichkeit der unterschiedlich intensiven Pigmente von *M. pachydermatis*. Gemeinsamkeiten mit *M. furfur* wurden deutlich. Neben dem für *M. pachydermatis* bereits nachgewiesenen Pityriacitrin (Mayser 2004) kommen auch Pityriarubine (Irlinger 2004) und Pityrialacton (Mayser 2003) als gemeinsame Pigmentbestandteile in Betracht.

Sowohl die physiologisch-biochemischen als auch genetischen Ergebnisse zeigen eine hohe Heterogenität in der Spezies *M. pachydermatis* an: 25 verschiedene physiologisch-biochemische Profile und 28 Genotypen. Darüber hinaus weisen die physiologisch-biochemisch gefundenen Typen bei der RAPD Analyse mit dem Primer Rp-Malas-1 keine charakteristischen genetischen Profile auf.

Die pigmentbildende Subgruppe konnte zum ersten Mal als heterogen beschrieben werden. Hier ließen sich acht physiologisch-biochemische und 14 genetische Typen (12 Cluster mit ausschließlich Pigmentbildnern sowie zwei Cluster sowohl mit Pigmentbildnern als auch Nicht-Pigmentbildnern) unterscheiden. Von letzteren konnte keiner Typ B zugeordnet werden. Damit konnte der Nachweis einer gemeinsamen Genetik von *M. pachydermatis*-Pigmentbildnern und *M. furfur*, basierend auf ihrer gemeinsamen Stoffwechsellistung der Pigmentbildung, mit dieser Methode und diesem Primer nicht erfolgen. Ihre genetische Verwandtschaft kann aber weiterhin angenommen werden, auch könnte die pigmentbildende Subgruppe eine eigene Spezies innerhalb *M. pachydermatis* darstellen.

Die beschriebene Heterogenität wird angesichts vier definierter Bandenbereiche (1083-989, 995-863, 860-751 und 430-369 bp), die Pigmentbildung statistisch vorhersagen ( $p < 0,001$ ), relativiert. Die Methode der RAPD in Verbindung mit dem Primer Rp-Malas-1 und einem multivariaten logistischen Regressionsmodell ist damit interessant im Hinblick auf einen klinischen Test zur schnellen Ermittlung von Pigmentbildnern (wenige Stunden), zumal Pigmentbildung als Pathogenitätsfaktor in Frage kommt. Bislang wurde Pigmentbildung auf Tryptophan-haltigem Medium in einem Kulturverfahren nach 2-3 Wochen nachgewiesen (Mayser 2004).



## 6 Summary

To gain insight into subgroups of the heterogeneous species *Malassezia pachydermatis*, 205 wild isolates from indigenous animals, the reference strains CBS 1879 and 1892 and three strains of Type B out of the collection of Aizawa and Kano (2001) were investigated. In detail, they were examined for culture morphology, catalase and  $\beta$ -glucosidase activity, lipid assimilation (Tween 20, 40, 60, 80; Cremophor EL) and carbohydrate assimilation (lactate, sucrose, d-glucose, l-sorbose, glycerol, d-sorbitol, succinate, d-mannitol, lactose). Genetic variability was assessed on 114 strains by means of RAPD (random amplified polymorphic DNA, primer Rp-Malas-1). Furthermore, the tryptophan-dependent synthesis of pigments and fluorochromes, which is particularly observed with *M. furfur* (Mayser and Wille 1998), was tested with the aim of further characterizing pigment-producing *M. pachydermatis* strains (Mayser 2004) in terms of biochemistry, physiology and genetics.

Some compounds of these pigments and fluorochromes could be already identified (Mayser 2003, Irlinger 2005) and may be a pathogenetic factor in *Malassezia*-associated diseases such as pityriasis versicolor (Krämer and Podobinska 2005, Krämer and Kessler 2005).

Exemplarily, the varying intensity of pigment production was analyzed by means of column chromatography and thin-layer chromatography (Mayser and Wille 1998) and the results were compared to the pigment production of *M. furfur*.

With regard to a quick and reliable clinical test for identification of pigment producers it was investigated whether pigment producers have a characteristic profile, in particular a genetic one. A multivariate logistic regression model was applied for statistical prediction of pigment production by the use of physiological-biochemical as well as genetic parameters.

Finally, it was determined whether pigment-producing *M. pachydermatis* strains can be genetically assigned to Type B according to Aizawa and Kano. The latter identified this subgroup which is particularly close to *M. furfur* by means of RAPD and sequencing of the Chitin Synthase 2 (CHS 2) gene. RAPD was carried out according to the method of Aizawa and Kano (2001).

All strains tested were active for catalase and  $\beta$ -glucosidase. D-glucose as well as Tween 40, 60 and 80 were always assimilated, glycerol, d-mannitol, d-sorbitol, succinate, Tween 20 and Cremophor differently (99; 46; 41; 2; 4; 66%). Apart from pigment producers of varying intensity, strains devoid of pigment and among the latter those with white ring formation were found (40; 60; 42%). The comparative analysis of pigments showed a high similarity of differently intense pigments of *M. pachydermatis*. Besides, an analogy to *M. furfur* was demonstrated. Apart from pityriacitrin which was found already in *M. pachydermatis* (Mayser 2004), pityriarubins (Irlinger 2004) and pityrialacton (Mayser 2003) can also be considered as a common component of pigment production.

Both, physiological-biochemical as well as genetic results indicate a high heterogeneity among the species *M. pachydermatis*: 25 different physiological-biochemical profiles and 28 genotypes. In addition, RAPD analyses of physiological-biochemical types do not show specific genetic profiles with primer Rp-Malas-1.

The pigment-producing subgroup could be described for the first time as heterogeneous. Within it eight physiological-biochemical profiles and 14 genotypes (12 clusters with exclusively pigment producers and two clusters with both pigment and pigment non-producers) could be differentiated. Of the latter none could be assigned to Type B. Therefore, in spite of their common ability of pigment-production, common genetics of pigment-producing *M. pachydermatis* and *M. furfur* could not be demonstrated with this method and primer. However their genetic relatedness can be still assumed. Besides, pigment-producing isolates of *M. pachydermatis* might represent an independent species within *M. pachydermatis*.

In spite of the reported heterogeneity, using four defined RAPD band areas as genetic variables (1083-989, 995-863, 860-751 and 430-369 bp), the occurrence of pigment formation was statistically predicted significantly ( $p < 0.001$ ).

These results demonstrate that the conjunction of RAPD with primer Rp-Malas-1 and a multivariate logistic regression model is interesting with regard to clinical tests for rapid determination of pigment producers (a few hours), as pigment production may be a pathogenetic factor. So far, results of the pigment test on tryptophan-containing medium are available only after 2-3 weeks of cultivation (Mayser 2004).

## 7 Literaturverzeichnis

- Acton, H.W., Panja, J.: Seborrheic dermatitis or pityriasis capitis: A lesion caused by *Malassezia ovale*. Indian. Med. Gaz. 62, 603-614, 1927; Zit.: Zbl. Haut Geschl. Kr. 26: 806-808, 1928
- Aizawa, T., Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., Hasegawa, A.: Molecular heterogeneity of *Malassezia pachydermatis* in animal isolates. Vet. Microbiol. 70: 67-75, 1999
- Aizawa, T., Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., Hasegawa, A.: The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. Med. Mycol. 39: 329-334, 2001
- Ajello, I., Georg, I.K., Kaplan, W., Kaufmann, I.: Laboratory Manual for Medical Mycology. Pub. Hlth. Service, CDC, Atlanta, Georgia, 1963
- Anthony, R.M., Howell, S.A., Lloyd, D.H., Pinter, L.: Application of DNA Typing Methods to the Study of the Epidemiology of *Malassezia pachydermatis*. Microbial Ecol. Health and Dis. 7: 161-168, 1994
- Bandhaya, M.: The distribution of *Malassezia furfur* and *Malassezia pachydermatis* on normal human skin. Southeast Asean J. Trop. Med. Public Health 24: 343-346, 1993
- Baillon, E.H.: Traité de botanique médicale cryptogamique suivi du tableau. Paris, Faculté de Médecine de Paris: p. 234, 1889
- Balus, L., Grigoriu, D.: Pityriasis versicolor. Alsbach, Cilag GmbH, 1982
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D.: Yeasts: Characteristics and Identification. 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1990
- Bartish, I.V., Jeppsson, N., Nybom, H.: Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Molecular Ecology 8: 791-802, 1999
- Bauwens, L., De Vroey, C., De Meurichy, W.: A case of exfoliative dermatitis in a captive southern white rhinoceros (*Ceratotherium sinu sinu*). J. Zoo Wildl. Med. 27: 271-274, 1996
- Baxter, M.: The association of *Pityrosporum pachydermatis* with the normal external ear canal of dogs and cats. J. Small Anim. Pract. 17: 231-234, 1976

- Bergbrant, I.M., Faergemann, J.: Seborrhoeic dermatitis and *Pityrosporum ovale*: a cultural and immunological study. *Acta Derm. Venereol.* 69: 332-335, 1989
- Bergbrant, I.M., Faergemann, J.: Adherence of *Malassezia furfur* to human stratum corneum cells in vitro: a study of healthy individuals and patients with seborrhoeic dermatitis. *Mycoses* 37: 5-6, 1994
- Bliss, E.L.: Tinea versicolor dermatomycosis in the goat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184: 1512-1513, 1984
- Boekhout, T., Kamp, M., Guého, E.: Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Med. Mycol.* 36: 356-372, 1998
- Bond, R., Rose, J.F., Ellis, J.W., Lloyd, D.H.: Comparison of two shampoos for treatment of *Malassezia pachydermatis*-associated seborrhoeic dermatitis in basset hounds. *J. Small Anim. Pract.* 36: 99-104, 1995
- Bond, R., Saijonmaa Koulumies, L.E.M., Lloyd, D.H.: Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *J. Small Anim. Pract.* 36: 147-150, 1995
- Bond, R.: *M. pachydermatis*: colonisation and infection of canine skin. Thesis, Royal Veterinary College, University of London, 215, 1996
- Bond, R.: *M. pachydermatis* and canine skin disease. *Waltham Focus*, 7: 27-32, 1997
- Bond, R., Howell, S.A., Haywood, P.J., Lloyd, D.H.: Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. *Vet. Rec.* 141: 200-201, 1997
- Bond, R., Mason, I.: Antifungal therapy. In: Willemsse, T., Kwochka, K.W., Ihrke, P.J., eds. *Advances in Veterinary Dermatology*, Vol. 3 London: Butterworth Heinemann: 425-427, 1998
- Bond, R., Lloyd, D.H.: The relationship between population sizes of *Malassezia pachydermatis* in healthy dogs and in basset hounds with *M. pachydermatis*-associated seborrhoeic dermatitis and adherence to canine corneocytes in vitro. In: Willemsse, T., Kwochka, K.W., Ihrke, P.J., eds. *Advances in Veterinary Dermatology*, Vol. 3 London: Butterworth Heinemann: 284-289, 1998
- Bond, R., Lamport, A.I., Lloyd, D.H.: Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. *Res. Vet. Sci.* 68(3): 291-3, 2000

- Bond, R., Patterson-Kane, J.C., Lloyd, D.H.: Intradermal test reactivity to *Malassezia pachydermatis* in healthy basset hounds and basset hounds with *Malassezia* dermatitis. *Vet. Rec.* 27; 151(4): 105-9, 2002
- Breierova, E., Kockova-Kratochvilova, A., Sajbidor, J., Ladzianska, K.: *Malassezia pachydermatis*: properties and storage. *Mycoses* 34: 349-352, 1991
- Brotherton, J.: Lack of swelling and shrinking of *Pityrosporum ovale* in media of different osmotic pressures and its relationship with survival in the relatively dry condition of the scalp. *J. Gen. Microbiol.* 48: 305-308, 1967
- Cannon, P.F.: International Commission on the taxonomy of fungi (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medical importance, Part 2. *Microbiological Sciences* 3: 285-287, 1986
- Caprilli, F., Mercantini, R., Nazzaro Porro, M., Passi, S., Tonolo, A.: Studies of the genus *Pityrosporum* in submerged culture. *Mycopath. Mycol. Appl.* 51: 171-189, 1973
- Carlotti, D.N., Hubert, B., Delmas, H., Magnol, J.P.: Les mycoses superficielles chez le chat, *Prat. Méd. Chir. Anim. Compagnie* 28: 241-257, 1993
- Castella, G., Hernandez, J.J., Cabanes, F.J.: Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. *Vet. Microbiol.* 108 (3-4): 291-6, 2005
- Castellani, A., Chalmers, A.: *Manual of tropical medicine*, 2nd edn., London, Baillière Tindall & Cox, 1913
- Chang, H.J., Miller, H.L., Watkins, N.W. et al.: An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care unit nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs, *New Engl. J. Med.* 338: 706-711, 1998
- Chen, T.A, Halliwell, R.E, Hill, P.B.: Failure of extracts from *Malassezia pachydermatis* to stimulate canine keratinocyte proliferation in vitro. *Vet. Dermatol.* 13(6): 323-9, 2002
- Chen, T.A, Halliwell, R.E, Shaw, D.J., Hill, P.B.: Assessment of the ability of *Malassezia pachydermatis* to stimulate proliferation of canine keratinocytes in vitro. *Am. J. Vet. Res.* 65(6): 787-96, 2004
- Chryssanthou, E., Broberger, U., Petrini, B.: *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr.* 90(3): 323-7, 2001
- Civila, F.S., Vignale, R., Sanjines, A., Conti-Diaz, I.A.: Hyphal production by *Pityrosporum ovale*. *Int. J. Derm.* 17: 74-77, 1978

- Crespo, M.J., Abarca, M.L., Cabanes, F.J.: Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa, *Med. Mycol.* 40: 115-121, 2002
- Crespo, M.J., Abarca, M.L., Cabanes, F.J.: Occurrence of *Malassezia* spp. in horses and domestic ruminants. *Mycoses* 45 (8): 333-7, 2002
- Dice, L.R.: Measures of the amount of ecologic associations between species. *J. Ecol.* 26: 197-302, 1945
- Dinsdale, J.R., Rest, J.R.: Yeast infections in ferrets. *Vet. Rec.* 135: 647-648, 1995
- Dodge, C.W.: *Medical Mycology*. St. Louis: C. V. Mosby, 1935
- Dorn, M., Roehnert, K.: Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J. Invest. Derm.* 69: 224-248, 1977
- Dorogi, J.: Pathological and clinical aspects of the diseases caused by *Malassezia* species. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 49(2-3): 363-9, 2002
- Duarte, E.R., Lachance, M.A., Hamdan, J.S.: Identification of atypical strains of *Malassezia* spp. from cattle and dog. *Can. J. Microbiol.* 48(8): 749-52, 2002
- Dufait, R.: *Pityrosporum canis* as the cause of canine chronic dermatitis. *Vet. Med./ Small Anim. Clin.* 78: 1055-1057, 1983
- Dufait, R.: Présence de *Malassezia pachydermatis* ( syn. *Pityrosporum canis*) sur les poils et les plumes des animaux domestiques. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd.* 14: 19-22, 1985
- Duverne, M.M.J., Volle, H., Gogue, Y., Perret, J.: Papillomatose confluente et réticulée de Gougerot et Carteaud avec présence d'un pityriasis versicolor. *Bull. Dermatol.* 73: 335-338, 1966
- Eichstedt, C.F.: Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. *Froriep's Neue Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde* 853: 270-271, 1846
- Faergemann, J., Fredriksson, T.: Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin. *Acta Derm. Venereol.* 60: 531-33, 1980
- Faergemann, J., Bernander, S.: Micro-aerophilic and anaerobic growth of *Pityrosporum* species. *Sabouraudia* 19: 117-121, 1981
- Faergemann, J., Jones, T.C., Hettler, O., Loria, Y.: *Pityrosporum ovale* (*Malassezia furfur*) as the causative agent of seborrheic dermatitis: new treatment options. *Br. J. Derm.* 134, Supp 46: 12-15, 1996

- Fraser, G.: *Pityrosporum pachydermatis* Weidman of canine origin. Transactions of the British Mycological Society 44: 441-448, 1961
- Girao, M.D., Prado, M.R., Brillante, R.S., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J., Rocha, M.F.: *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: A comparative analysis. Vet. J. (Epub ahead of print), 2005
- Giusiano, G.E.: *Malassezia*. Current knowledge and study perspectives. Rev. Argent. Microbiol. 38(1): 41-8, 2006
- Godfrey, D.R.: A case of feline paraneoplastic alopecia with secondary *Malassezia*-associated dermatitis. J. Small Anim. Pract. 39: 394-396, 1998
- Gordon, M.A.: The lipophilic mycoflora of the skin. I. In vitro culture of *Pityrosporum orbiculare* n.sp. Mycologia 43: 524-535, 1951
- Gordon, M.A.: *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis* (Weidman) Dodge (1935). Sabouraudia 17: 305-309, 1979
- Greene, C.E.: Integumentary infections, In: Greene CE, ed. Infectious Diseases of the Dog and Cat, 2nd edn. Philadelphia: W.B. Saunders: 547- 554, 1998
- Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A.M.: Developments in fungal taxonomy. Clin. Microbiol. Rev., 12: 454-500, 1999
- Guého, E., Simmons, R.B., Pruitt, W.R., Meyer, S.A., Ahearn, D.G.: Association of *Malassezia pachydermatis* with systemic infections of humans. J. Clin. Microbiol. 25: 1789-90, 1987
- Guého, E., Meyer, S.A.: A re-evaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. Antonie van Leeuwenhoek 55: 245-251, 1989
- Guého, E., Midgley, G., Guillot, J.: The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 69: 337-355, 1996
- Guillot, J., Chermette, R., Guého, E.: Prévalence du genre *Malassezia* chez les mammifères. J. Mycol. Méd. 4: 72-79, 1994
- Guillot, J., Guého, E.: The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. Antonie van Leeuwenhoek 67: 297-314, 1995
- Guillot, J.: Taxonomie et phylogénie des levures du genre *Malassezia*, Thesis, University of Paris XII, 1995

- Guillot, J., Guého, E., Prevost, M.C.: Ultrastructural features of the dimorphic yeast *Malassezia furfur*, J. Mycol. Med. 5: 86-91, 1995
- Guillot, J., Guého, E., Chermette, R.: Confirmation of the nomenclatural status of *Malassezia pachydermatis*. Antonie van Leeuwenhoek 67: 173-176, 1995
- Guillot, J., Guého, E., Lesourd, M., Midgley, G., Chévrier, G., Dupont, B.: Identification of *Malassezia* species, A practical approach. J. Mycol. Méd. 6: 103-110, 1996
- Guillot, J., Guého, E., Chevrier, G., Chermette, G.: Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. Res. Vet. Sci. 62: 22-25, 1997
- Guillot, J., Petit, T., Rubial-Degorce, F., Guého, E., Chermette, R.: Dermatitis caused by *Malassezia pachydermatis* in a Californian sea lion (*Zalophus californianus*). Vet. Rec. 142: 311-312, 1998
- Guillot, J., Bond, R.: *Malassezia pachydermatis*: a review. Med. Mycol. 37: 295-306, 1999
- Gupta, A.K., Bluhm, R., Summerbell, R.: Pityriasis versicolor. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 16: 19-33, 2002
- Gupta, A.K., Boekhout, T., Theelen, B., Summerbell, R., Batra, R.: Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. J. Clin. Microbiol. 42: 4253-4260, 2004
- Gustafson, B.A.: Otitis externa in the dog. A bacteriological and experimental study. Royal veterinary College of Sweden, Stockholm, 1955
- Gustafson, B.A.: The occurrence of yeasts belonging to the genus *Pityrosporum* in different kinds of animals, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 48: 51-55, 1960
- Hajsig, M., Tadic, V., Lukman, P.: *Malassezia pachydermatis* in dogs: significance of its location. Vet. Arhiv 55: 259-266, 1985
- Hay, R.J., Roberts, S.O.B., Mackenzie, D.W.R.: Pityriasis versicolor. In: Textbook of Dermatology (Champion, R.H., Burton, J.L., Ebling, F.J.G, eds) 6th edn. Vol. 2. Oxford: Blackwell Scientific Publications: pp. 1286-90, 1998
- Heng, M.C.Y., Henderson, C.L., Barker, D.C., Haberfelde, G.: Correlation of *Pityrosporum ovale* density with clinical severity of seborrhoeic dermatitis assessed by a simplified technique. J. Am. Acad. Dermatol. 23: 82-86, 1990



- Henke, H.: Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20. Heidelberg: Hüthig Verlag, 1995
- Hirai, A., Kano, R., Makimura, K., Duarte, E.R., Hamdan, J.S., Lachance, M.A., Yamaguchi, H., Hasegawa, A.: *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 623-7, 2004
- Hossain, H., Ansari, F., Schulz-Weidner, N., Wetzel, W.E., Chakraborty, T., Domann, E.: Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. Oral Microbiol. Immunol. 18(5): 302-8, 2003
- Huang, H.P., Little, C.J., Fixter, L.M.: Effects of fatty acids on the growth and composition of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa. Res. Vet. Sci. 55: 119-123, 1993
- Hunter, P.R., Fraser, C.A.M.: Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 27: 2156-60, 1989
- Ingham, E., Cunningham, A.C.: *Malassezia furfur*. J. Vet. Med. Mycol. 31: 265-288, 1993
- Irlinger, B., Krämer, H.J., Mayser, P., Steglich, W.: Pityriarubins, biologically active Bis(indolyl)spirans from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*. Angewandte Chemie Int. Ed. 43: 1098-1100, 2004
- Irlinger, B., Bartsch, A., Krämer, H.J., Mayser, P., Steglich, W.: New indole metabolites from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*. Helvetica chimica acta 88: 1472-1485, 2005
- Kano, R., Aizawa, T., Nakamura, Y., Watanabe, S., Hasegawa, A.: Chitin synthase 2 gene sequence of *Malassezia* species. Microbiol. Immunol. 43: 813-815, 1999
- Kennis, R.A., Rosser, E.J. Jr., Olivier, N.B., Walker, R.W.: Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 208: 1048-51, 1996
- Kiss, G., Papp, L.: Diagnosis and therapy of diseases due to *Malassezia pachydermatis* (in Hungarian, with English abstract). Magyar Allatorvosok Lapja 49: 745-748, 1994
- Kiss, G., Radvanyi, S., Szigeti, G.: Characteristics of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from canine otitis externa. Mycoses 39: 313-321, 1996

- Krämer, H.J., Kessler, D., Hipler, U.C., Irlinger, B., Hort, W., Bödeker, R.H., Steglich, W., Mayser, P.: Pityriarubins, novel highly selective inhibitors of respiratory burst from cultures of the yeast *Malassezia furfur*. *Chem. Biochem.* 6:1-9, 2005
- Krämer, H.J., Podobinska, M., Bartsch, A., Thoma, W., Bernd, A., Kummer, W., Steglich, W., Mayser, P.: Malassezin, a novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chem. Biochem.* 6: 860-65; 2005
- Kurtzmann, C.P., Robnett, C.J.: Orders and families of ascosporogenous yeasts and yeast-like taxa compared from ribosomal RNA sequence similarities, In: Hawksworth, D.L., ed. *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties*, New York: Plenum Press, 249-258, 1994
- Labows, J.N., McGinley, K.J., Leyden, J.J.: Characteristic gamma-lactone odor production of the genus *Pityrosporum*. *Appl. Environm. Microbiol.* 38: 412-415, 1975
- Lodder, J.: Genus 3. *Pityrosporum* Sabouraud. In: Kreger-van Rij, NJW (Ed.) *The yeasts. A taxonomic study*. 1st edn., Amsterdam: North Holland Publishing Company, pp. 440-445, 1952
- MacPherson, J.M., Eckstein, P.E., Scoles, G.J., Gajadhar, A.A.: Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Mol. Cell. Probes* 7(4): 293-9, 1993
- Maheswari-Amma, S., Paniker, C.K.J.: Variation of morphologic characters in *Pityrosporum* strains. *Ind. J. Med. Res.* 76: 557-560, 1982
- Makimura, K., Tamura, Y., Kudo, M., Uchida, K., Saito, H., Yamaguchi, H.: Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Med. Microbiol.* 49: 29-35, 2000
- Mancianti, F., Rum, A., Nardoni, S., Corazza, M.: Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. *Mycopathologia* 149(3): 131-5, 2001
- Mansfield, P.D.: Infectivity of *Malassezia pachydermatis* in the external ear canal of dogs. *J. Am. Animal Hospital. Assoc.* 26: 97-100, 1990
- Marcon, M.J., Powell, D.A.: Human infections due to *Malassezia* spp.. *Clin. Microbiol.* 5: 101-119, 1992

- Marples, M.J.: The genus *Pityrosporum*. In: The Ecology of the Human Skin. Springfield: C.C. Thomas, pp. 408-422, 1965
- Marples, R.R., McGinley, K.J., Mills, O.H.: Microbiology of comedones in acne vulgaris. J. Invest. Derm. 60: 80-83, 1973
- Martin-Scott, I.: The *Pityrosporum ovale*. Brit. J. Derm. 64: 257-273, 1952
- Mason, K.V., Evans, A.G.: Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 27: 13-20, 1991
- Masuda, A., Sukegawa, T., Tani, H., Miyamoto, T., Sasai, K., Morikawa, Y., Baba, E.: Attachment of *Malassezia pachydermatis* to the ear dermal cells in canine otitis externa. J. Vet. Med. Sci. 63(6): 667-9, 2001
- Mathieson, I., Fixter, L.M., Little, C.J.L.: Enzymatic activity of *Malassezia pachydermatis*. Proc. Third World Congress of Veterinary Dermatology, Edinburgh, UK: 69, September 1996
- Matousek, J.L, Campbell, K.L, Kakoma, I., Solter, P.F., Schaeffer, D.J.: Evaluation of the effect of pH on in vitro growth of *Malassezia pachydermatis*. Can. J. Vet. Res. 67(1): 56-9, 2003
- Mayser, P., Scheurer, C., Papavassilis, C., Gründer, K.: Hydrolase activity in 150 strains of *Malassezia furfur*. Mycoses 39: 225-231, 1996
- Mayser, P., Haze, P., Papavassilis, C., Pickel, M., Gründer, K., Gueho, E.: Differentiation of *Malassezia* spp. - selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *Malassezia furfur*. Br. J. Derm. 137: 208-213, 1997 (a)
- Mayser, P.: Beiträge zur Differenzierung der Gattung *Malassezia* und der Pathogenese der Pityriasis versicolor. Habil Schrift, Fachverlag Köhler, Gießen, 1998
- Mayser, P., Wille, G., Imkampe, A., Thoma, W., Arnold, N., Monsees, T.: Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophane as single nitrogen source. Mycoses, 41 Suppl 2: 74-7, 1998
- Mayser, P., Groß, A.: IgE Antibodies to *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis* and *Pityrosporum orbiculare* in patients with atopic dermatitis, seborrhoeic Eczema or pityriasis versicolor and identification of respective allergens. Acta Derm. Venereol., 2000
- Mayser, P., Schäfer, U., Krämer, H.J., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityriacitrin a ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. Arch. Dermatol. Res. 94: 131-4, 2002

- Mayser, P., Stapelkamp, H., Krämer, H.J., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityrialacton – a new fluorescing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 185-191, 2003
- Mayser, P., Töws, A., Krämer, H.J., Weiß, R.: Further characterization of pigment-producing *Malassezia* strains. *Mycoses*, 47: 34-39, 2004
- Mc Ginley, K.J., Leyden, L.J., Marples, R.R., Kligman, A.M.: Quantitative microbiology of the scalp in non-dandruff, dandruff and seborrheic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 64: 401-405, 1975
- Meinhof, W., Braun-Falco, O.: Über lipotrophe Hefen auf der menschlichen Haut und deren Bedarf an bestimmten Fettsäuren. *Fette Seifen Anstrichmittel* 69: 861-4, 1967
- Merck Index, 12th edn., Rahway, New Jersey, USA: Merck & Co. Inc., 1996
- Meunier, J.R., Grimont, P.A.: Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144(5): 373-9, 1993
- Mickelsen, P.A., Viano-Paulson, M.C., Stevens, D.A., Diaz, P.: Clinical and microbiological features of infection with *M. pachydermatis* in high-risk infants. *J. Infect. Dis.* 157: 1163-1168, 1988
- Midgley, G.: The diversity of *Pityrosporum (Malassezia)* yeasts in vivo and in vitro. *Mycopathologia* 106: 143-53, 1989
- Midgley, G., Schechtman, R.C.: Molecular typing of *Malassezia* isolates by Restriction Fragment Length Polymorphisms. XII Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Adelaide Australia, Poster 426, March 1994
- Midgley, G.: The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. *Medical Mycology* 38, suppl. I: 9-16, 2000
- Midreuil, F., Guillot, J., Gueho, E., Renaud, F., Mallie, M., Bastide, J.M.: Genetic diversity in the species *Malassezia pachydermatis* analysed by multilocus enzyme electrophoresis. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1287-1294, 1999
- Mittag, H.: Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. *Mycoses* 38: 13-21, 1995
- Nakagaki, K., Hata, K., Iwata, E., Takeo, K.: *Malassezia pachydermatis* isolated from a South American sea lion (*Otaria byronia*) with dermatitis. *J. Vet. Med. Sci.* 62(8): 901-3, 2000

- Nazzaro Porro, M., Passi, S., Caprilli, F., Nazzaro, P., Morpurgo, G.: Growth requirement and lipid metabolism of *Pityrosporum orbiculare*. J. Invest. Derm. 66: 178-82, 1976
- Nazzaro Porro, M., Passi, S., Caprilli, F., Mercantini, R.: Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. J. Invest. Derm. 69: 531-534, 1977
- Nishimura, K., Asada, Y., Tanaka, S., Watanabe, S.: Ultrastructure of budding process of *Malassezia pachydermatis*. J. Med. Vet. Mycol. 29: 387-393, 1991
- Noble, W.C., Midgley, G.: Scalp carriage of *Pityrosporum* species: The effect of physiological maturity, sex and race. Sabouraudia 16: 229-232, 1978
- Noble, W.C.: Microbiology of Human Skin. London: Lloyd-Duke. pp. 3-65; 263-268, 1981
- Paulino, L.C., Tseng, C.H., Strober, B.E., Blaser, M.J.: Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesions. J. Clin. Microbiol. 44(8): 2933-41, 2006
- Plant, J.D., Rosenkranz, W.S., Griffin, C.E.: Factors associated with a prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. J. Am. Vet. Med. Assoc. 201: 879-885, 1992
- Potter, B.S., Burgoon, C.F., Johnson, W.C.: *Pityrosporum* folliculitis. Report of seven cases and review of the *Pityrosporum* organism relative to cutaneous disease. Arch. Dermatol. 107: 388-391, 1973
- Rhie, S., Turcios, R., Buckley, H., Suh, B.: Clinical features and treatment of *Malassezia* folliculitis with fluconazole in orthotopic heart transplant recipients. J. Heart Lung Transplant 19(2): 215-9, 2000
- Riciputo, R.M., Oliveri, S., Micali, G., Sapuppo, A.: Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. Mycoses 39: 233-235, 1996
- Robin, C.: Histoire naturelle des vegetaux parasites. Paris: JB Baillière, 1853
- Romano, A., Segal E., Blumenthal, M.: Canaliculitis with isolation of *Pityrosporum pachydermatis*. Brit. J. Ophthalmol. 62: 732-734, 1978
- Rosychuk, R.A.W., Luttgen, P.: Disease of the ear. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine, Diseases of the Dog and Cat, 5th edn. Philadelphia: W.B. Saunders: 986-1002, 2000
- Sabouraud, R.: Maladies du cuir chevelu. II. Les maladies desquamatives. Paris: Masson, 1904

- Saez, H.: *Pityrosporum pachydermatis*: caractéristiques morphobiochimiques; fréquence comparée chez l'animal et chez l'homme. Ann. Méd. Vét. 126: 645-650, 1982
- Salkin, I.F., Gordon, M.A.: Polymorphism of *Malassezia furfur*. Canad. J. Microbiol. 23: 471-475, 1977
- Salkin, I.F., Gordon, M.A., Stone, W.B.: *Pityrosporum pachydermatis* in a black bear (*Ursus americanus*). Sabouraudia 16: 35-38, 1978
- Sanguinetti, V., Tampieri, M.P., Morganti, L.: A survey of 120 isolates of *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. Mycopathologia 85: 93-95, 1984
- Senczek, D., Siesenop, U., Bohm, K.H.: Characterization of *Malassezia* species by means of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic karyotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Mycoses 42(5-6): 409-14, 1999
- Shifrine, M., Marr, A.G.: The requirement of fatty acids by *Pityrosporum ovale*. J. Gen. Microbiol. 32:263-270, 1963
- Simmons, R.B., Ahearn, D.G.: Cell wall ultrastructure and diazonium blue B reaction of *Sporopachydermia quercum*, *Bullera tsugae*, and *Malassezia* spp. Mycologia 79: 38-43, 1987
- Simmons, R.B., Gueho, E.: A new species of *Malassezia*. Mycol. Res. 94: 1146-1149, 1990
- Slooff, W.Ch.: Genus *Pityrosporum* Sabouraud. In: The Yeasts - A Taxonomic Study (Hrsg. J. Lodder) 2nd edition, Amsterdam: North-Holland Publishing Company, pp. 1167-1186, 1970
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R.: Numerical taxonomy. The principle and practice of numerical classification. W. H. Freeman & Co., San Francisco, California, USA, 1973
- Staib, F., Geier, R.: Proteolysis products of *Candida albicans* as a substratum for growth of *Staphylococcus aureus*, Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene, 218: 374-375, 1971
- Sugita, T., Takashima, M., Shinoda, T., Suto, H., Unno, T., Tsuboi, R., Ogawa, H., Nishikawa, A.: New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. J. Clin. Microbiol. 40: 1363-1367, 2002
- Sugita, T., Takashima, M., Kodama, M., Tsuboi, R., Nishikawa, A.: Description of a new yeast species *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. J. Clin. Microbiol. 41 (10): 4695-4699, 2002

- Sugita, T., Tajima, M., Takashima, M., Amaya, M., Saito, M., Tsuboi, R., Nishikawa, A.: A New Yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a Patient with Seborrheic Dermatitis, and Its Distribution in Patients and Healthy Subjects. *Microbiol. Immunol.* 48:579-83, 2004
- Swift, J.A., Dunbar, S.F.: The ultrastructure of *Pityrosporum ovale* and *Pityrosporum canis*. *Nature* 206:1174-1175, 1965
- Takahashi, M., Ushikima, T., Ozaki, Y.: A growth promoting agent for *Pityrosporum* produced by some species of *Staphylococcus*. *Jap. J. Med. Mycol.* 23: 240-245, 1982
- Thompson, E., Colvin, J.R.: Composition of the cell wall of *Pityrosporum ovale* (Bizzozero) Castellani & Chalmers. *Can. J. Microbiol.* 16: 263-265, 1970.
- Trevino-Castellano, M., Rodriguez-Novoa, S., Llovo-Taboada, J., Garcia-Zabarte, A., Garcia-Riestra, C., Rigueiro-Garcia, B.J.: Combined used of RAPD and touchdown PCR for epidemiological studies of *Aspergillus fumigatus*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21: 472-6, 2003
- Ushijima, T., Takahashi, M., Ozaki, Y.: Selective and differential media for isolation and tentative identification of each species of *Pityrosporum* residing on normal and diseased human skin. *Microbiol. Immunol.* 25:1109-1118, 1981
- Van Abbe, N.J.: The investigation of dandruff. *J. Soc. Cosm. Chemists* 15: 609-630, 1964
- Van Belkum, A., Boekhout, T., Bosboom, R.: Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2528-2532, 1994
- Weary, P.E.: Comedogenic potential of the lipid extract of *Pityrosporum ovale*. *Arch. Derm.* 102: 84-91, 1970
- Weidman, F.D.: Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) with the description of the new yeast species *Pityrosporum pachydermatis*. In: Fox A. (Ed.): Report of the Laboratory of comparative pathology of the zoological society of Philadelphia. pp. 36-44, 1925
- Weiss, R., Raabe, P., Mayser, P.: Sprosspilze der Gattung *Malassezia*: Taxonomische Einteilung und Bedeutung aus (veterinär-) medizinischer Sicht. *Mycoses* 43 (suppl.1), 69-72, 2000
- Welsh, J., McClelland, M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18(24): 7213-7218, 1990

- Weseler, A., Geiss, H.K., Saller, R., Reichling, J.: Antifungal effect of Australian tea tree oil on *Malassezia pachydermatis* isolated from canines suffering from cutaneous skin disease. Schweiz Arch. Tierheilkd. 144(5): 215-21, 2002
- Wessels, M.W., Doekes, G., van Ieperen-van Dijk, A.G., Koers, W.J., Young, E.: IgG-antibodies to *Pityrosporum ovale* in atopic dermatitis. Br. J. Derm. 125: 227-32, 1991
- White, S.D., Bourdeau, P., Blumstein, P., Ibish, K., Scott, K.V., Salman, N.D.: Comparison via cytology and culture of carriage of *Malassezia pachydermatis* in atopic and healthy dogs. Proc. Third World Congress of Veterinary Dermatology, Edinburgh, UK: 37, September 1996
- Whitlock, F.A.: *Pityrosporum ovale* and some scaly conditions of the scalp. Brit. Med. J. 1: 484-487, 1953
- Wilde, P.F., Stewart, P.S.: A study of the fatty acid metabolism of the yeast *Pityrosporum ovale*. Biochem. J. 108: 225-231, 1968
- Willan, R.: Description and treatment of the cutaneous diseases. Order II. Scaly diseases of the skin, London: pp.192-196, 1801
- Wille, G., Mayser, P., Thoma, W., Monsees, T., Baumgart, A., Schmitz, H.J., Schrenk, D., Polborn, K., Steglich, W.: Isolation and synthesis of Malassezin – an agonist of the arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*. J. Bioorg. Med. Chem. 9: 955–60, 2001
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18(22): 6531–6535, 1990
- Winiarczyk, S.: The ultrastructure of *Pityrosporum pachydermatis*, Archivum Veterinarium Polonicum. 32: 6-13, 1992
- Yarrow, D., Ahearn, D.G.: *Malassezia Baillon*. In: The yeasts: A taxonomic study (Kreger van Rij NJW, ed), 3rd edn., Amsterdam: North Holland Publishing Company. pp. 882-5, 1984
- Young, E., Koers, W.J., Berrens, L.: Intracutaneous tests with *Pityrosporum* extract in atopic dermatitis. Acta Derm. Venereol. 144: 122-124, 1989



## 8 Anhang

**Tabelle 13:** Physiologisch-biochemische Profile der 210 *M. pachydermatis*-Stämme; am Ende außerdem 7 Stämme, die im Kohlenhydratauxanogramm kein Ergebnis erbrachten

Stamm	Herkunft	Konsistenz	Esculin	Catalase	Zuckaux.	Pigment	Code	Typ	Fettaux.
7	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	
21	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	
46	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	
93	Hd / Rachen	1	1	1	1	1	11111	1	
101	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	
104	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	2/1
106	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	
110	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	
128	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	2
135	Hd. / Nase	1	1	1	1	1	11111	1	2/1
143	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	2
145	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	2
148	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	
152	Hd. / Haut	1	1	1	1	1	11111	1	2
164	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	2
206	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	2
212	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	2
217	Hd. / Ohr	1	1	1	1	1	11111	1	
ASC 21	Hd. / Haut	1	1	1	1	2	11112	2	2
32	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	
68	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	
71	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	1/1
74	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	
80	Hd. / Haut	1	1	1	1	2	11112	2	
85	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	2/1
91	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	

Stamm	Herkunft	Konsistenz	Esculin	Catalase	Zuckaux.	Pigment	Code	Typ	Fettaux.
98	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	
99	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	1/2
108	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	
136	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	
140	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	2
147	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	
167	Hd/Scheide	1	1	1	1	2	11112	2	2/1
220	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	
226	Hd. / Ohr	1	1	1	1	2	11112	2	
9	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
22	Ktz. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
27	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
45	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
50	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
53	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
60	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
61	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
66	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
67	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	2
69	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
70	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	2/1
76	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
77	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
83	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
86	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
90	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
107	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
116	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
117	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
120	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	

Stamm	Herkunft	Konsistenz	Esculin	Catalase	Zuckaux.	Pigment	Code	Typ	Fettaux.
124	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
139	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
146	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	2/2
150	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	2
156	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	2
158	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	2
159	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	2
182	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	2
195	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
196	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
225	Hd. / Ohr	1	1	1	1	3	11113	3	
227	Hd. / Haut	1	1	1	2	1	11121	4	2
89	Hd/Rachen	1	1	1	2	1	11121	4	
44	Hd. / Ohr	1	1	1	2	2	11122	5	
204	Hd. / Ohr	1	1	1	2	2	11122	5	2/1
127	Hd. / Ohr	1	1	1	2	3	11123	6	
205	Hd. / Ohr	1	1	1	2	3	11123	6	
215	Hd. / Ohr	1	1	1	2	3	11123	6	
2	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	2
5	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	
11	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	
16	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	
20	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	
26	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	
35	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	
39	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	
41	Hd. / Auge	1	1	1	3	1	11131	7	
47	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	
48	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	2
54	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	

Stamm	Herkunft	Konsistenz	Esculin	Catalase	Zuckaux.	Pigment	Code	Typ	Fettaux.
56	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	
78	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	2
115	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	
129	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	2
133	Ktz./Haut	1	1	1	3	1	11131	7	2/2
155	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	2/1
162	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	2
165	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	2
218	Hd. / Ohr	1	1	1	3	1	11131	7	
19	Hd. / Ohr	1	1	1	3	2	11132	8	
28	Ktz. / Ohr	1	1	1	3	2	11132	8	
36	Ktz. / Ohr	1	1	1	3	2	11132	8	2/1
49	Hd. / Ohr	1	1	1	3	2	11132	8	1/2
51	Hd. / Ohr	1	1	1	3	2	11132	8	
52	Hd. / Ohr	1	1	1	3	2	11132	8	
96	Hd. / Haut	1	1	1	3	2	11132	8	
132	Hd. / Haut	1	1	1	3	2	11132	8	2
173	Hd. / Haut	1	1	1	3	2	11132	8	2
181	Hd. / Ohr	1	1	1	3	2	11132	8	2
184	Ktz. / Ohr	1	1	1	3	2	11132	8	2
198	Hd. / Haut	1	1	1	3	2	11132	8	2
8	Hd. / Ohr	1	1	1	3	3	11133	9	
17	Ktz. / Ohr	1	1	1	3	3	11133	9	
31	Hd. / Ohr	1	1	1	3	3	11133	9	2/1
81	Hd. / Ohr	1	1	1	3	3	11133	9	
151	Hd./ Pfote	1	1	1	3	3	11133	9	2
213	Hd. / Ohr	1	1	1	3	3	11133	9	
119	Hd. / Ohr	1	1	1	4	2	11142	10	
183	Ktz. / Ohr	1	1	1	4	2	11142	10	2
216	Hd. / Ohr	1	1	1	5	1	11151	11	

Stamm	Herkunft	Konsistenz	Esculin	Catalase	Zuckaux.	Pigment	Code	Typ	Fettaux.
224	Hd. / Ohr	1	1	1	5	3	11153	12	
ASC 2	Hd. / Haut	1	1	1	6	2	11162	13	2
55	Hd. / Ohr	1	1	1	8	3	11183	14	
13	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	2
14	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	
30	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	2/1
87	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	
92	Hd. / Auge	2	1	1	1	1	21111	15	
95	Hd. / Haut	2	1	1	1	1	21111	15	
122	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	2
123	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	2
126	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	2
130	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	
142	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	2/1
154	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	2/2
170	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	2
171	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	2
177	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	2
187	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	
201	Hd. / Ohr	2	1	1	1	1	21111	15	
ASC20	Hd. / Haut	2	1	1	1	2	21112	16	2
12	Hd. / Ohr	2	1	1	1	2	21112	16	
18	Hd. / Ohr	2	1	1	1	2	21112	16	
34	Hd. / Ohr	2	1	1	1	2	21112	16	
65	Hd. / Ohr	2	1	1	1	2	21112	16	
73	Hd. / Haut	2	1	1	1	2	21112	16	
79	Hd. / Haut	2	1	1	1	2	21112	16	2
102	Hd. / Haut	2	1	1	1	2	21112	16	
125	Hd. / Haut	2	1	1	1	2	21112	16	2

Stamm	Herkunft	Konsistenz	Esculin	Catalase	Zuckaux.	Pigment	Code	Typ	Fettaux.
131	Hd. / Haut	2	1	1	1	2	21112	16	2
138	Hd. / Ohr	2	1	1	1	2	21112	16	2
157	Hd. / Ohr	2	1	1	1	2	21112	16	2
161	Hd. / Ohr	2	1	1	1	2	21112	16	2
175	Hd. / Ohr	2	1	1	1	2	21112	16	2/1
200	Hd. / Ohr	2	1	1	1	2	21112	16	2
10	Hd. / Ohr	2	1	1	1	2	21113	17	
58	Hd. / Ohr	2	1	1	1	3	21113	17	
82	Hd. / Ohr	2	1	1	1	3	21113	17	
88	Hd. / Ohr	2	1	1	1	3	21113	17	
137	Hd. / Ohr	2	1	1	1	3	21113	17	2
163	Hd. / Ohr	2	1	1	1	3	21113	17	2
186	Hd. / Ohr	2	1	1	1	3	21113	17	2/2
189	Hd./ Pfote	2	1	1	1	3	21113	17	2/1
199	Hd. / Ohr	2	1	1	1	3	21113	17	
210	Hd. / Ohr	2	1	1	1	3	21113	17	2/1
144	Hd. / Ohr	2	1	1	2	1	21121	18	
149	Hd. / Ohr	2	1	1	2	1	21121	18	2
178	Hd. / Ohr	2	1	1	2	1	21121	18	2/2
190	Hd. / Ohr	2	1	1	2	1	21121	18	
197	Hd. / Ohr	2	1	1	2	1	21121	18	
223	Hd. / Ohr	2	1	1	2	1	21121	18	
141	Hd. / Ohr	2	1	1	2	2	21122	19	2
CBS1892	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	2
1	Hd. / Haut	2	1	1	3	1	21131	20	
4	Hd. / Auge	2	1	1	3	1	21131	20	
38	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	
40	Hd. / Haut	2	1	1	3	1	21131	20	
43	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	

Stamm	Herkunft	Konsistenz	Esculin	Catalase	Zuckaux.	Pigment	Code	Typ	Fettaux.
59	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	
62	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	
72	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	1/2
84	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	2/1
100	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	
105	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	
109	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	
112	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	
121	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	
153	Hd./ Pfote	2	1	1	3	1	21131	20	2/2
188	Hd. / Haut	2	1	1	3	1	21131	20	
191	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	
203	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	2
207	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	2/1
209	Hd. / Ohr	2	1	1	3	1	21131	20	2/1
3	Hd. / Haut	2	1	1	3	2	21132	21	
6	Hd. / Ohr	2	1	1	3	2	21132	21	
24	Hd. / Ohr	2	1	1	3	2	21132	21	
29	Hd. / Ohr	2	1	1	3	2	21132	21	
42	Hd. / Ohr	2	1	1	3	2	21132	21	2
64	Hd. / Ohr	2	1	1	3	2	21132	21	
97	Hd. / Haut	2	1	1	3	2	21132	21	
111	Hd. / Ohr	2	1	1	3	2	21132	21	
134	Hd. / Haut	2	1	1	3	2	21132	21	2
168	Hd. / Ohr	2	1	1	3	2	21132	21	2
172	Hd. / Ohr	2	1	1	3	2	21132	21	2
176	Hd. / Haut	2	1	1	3	2	21132	21	2
179	Hd. / Haut	2	1	1	3	2	21132	21	2
193	Ktz. / Ohr	2	1	1	3	2	21132	21	
194	Hd. / Ohr	2	1	1	3	2	21132	21	

Stamm	Herkunft	Konsistenz	Esculin	Catalase	Zuckaux.	Pigment	Code	Typ	Fettaux.
221	Hd. / Ohr	2	1	1	3	2	21132	21	
222	Hd. / Haut	2	1	1	3	2	21132	21	
202	Hd. / Ohr	2	1	1	3	3	21133	22	2
57	Hd. / Haut	2	1	1	4	1	21141	23	
94	Hd. / Ohr	2	1	1	5	2	21152	24	2/2
CBS1879	Hd. / Ohr	2	1	1	7	2	21172	25	2
33	Hd. / Ohr	1	1	1	-	2			
166	Hd. / Ohr	1	1	1	-	2			2
192	Hd. / Ohr	1	1	1	-	3			
208	Hd. / Ohr	2	1	1	-	2			
211	Ktz. / Ohr	1	1	1	-	2			
214	Hd. / Ohr	2	1	1	-	1			2/1
219	Hd. / Ohr	2	1	1	-	1			

Zuckaux.: Kohlenhydratauxanogramm

Fettaux.: Lipidauxanogramm- hier erste Zahl Ergebnis beim Tweentest, zweite Zahl Ergebnis beim Cremophortest

grau unterlegt : pigmentbildende Subgruppen

### Legende des Zahlencodes ( siehe auch 3 Ergebnisse):

**Konsistenz:** 1= wässriger Film

2= deutlich trockener bis bröckelig

**Pigmenttest:** 1= stark Pigment

2= keine Pigmentbildung

3= ein weißer Ring

**Eskulin:** 1= positives Spaltungsergebnis

2= negatives Spaltungsergebnis

**Catalase:** 1= positives Catalase-Ergebnis

2= negatives Catalase-Ergebnis

**Zuckerauxanogramm (Assimilation von):**

1= D-Glukose und Glycerol

2= D-Glukose, Glycerol, D-Mannitol

3= D-Glukose, Glycerol, D-Sorbitol, D-Mannitol

4= D-Glukose, Glycerol, D-Sorbitol, Succinat, D-Mannitol

5= D-Glukose, Glycerol, D-Sorbitol

7= D-Glukose, D-Sorbitol, Succinat, D-Mannitol

8= D-Glukose

**Fettauxanogramm:** 1= Tween 20 hydrolysiert/ 1= Cremophor EL assimiliert

2= Tween 20 nicht hydrolysiert/ 2= Cremophor EL nicht assimiliert



**Tabelle 14:** Farbbanden und Fluorochrome des starken Pigmentbildners

Fraktion 1:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des schwachen Pigmentbildners vorhanden?	Fluoreszierend?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	schwach rosa	0,38	1 und 2	ja	nein	0,34; 3
2.	schwach violett	0,41	1 und 2	ja	nein	
3.	schwach rosa	0,44	1	nein	ja	

Fraktion 2:

1.	schwach grün	0,07	2	ja	ja	
2.	rötlich	0,09	2	ja	nein	0,08; 3 und 2
3.	orange-gelb	0,10-0,12	2	ja	nein	
4.	orange	0,18	2 und 3	ja	nein	0,14; 3 und 4; <b>Pityriarubin A</b>
5.	schwach orange-gelb	0,21	2,3 und 4	ja	ja	0,19; 3; <b>Pityrialacton</b>
6.	gelb-grün	0,25	2	nein	nein	
7.	rosa-braun	0,27	2	ja	nein	0,24; 3
8.	blau- grün	0,28-0,30	2	nein	nein	
9.	braun-gelb	0,30-0,35	2	ja	nein	
10.	violett	0,35	2,3 und 4	ja	nein	0,31; 4 und 5
11.	intensiv-rosa	0,36-0,37	1,2 und 3	ja	nein	0,34; 3
12.	blau-grün	0,37-0,41	1,2 und 3	ja	nein	0,37; 3
13.	türkis	0,41	2,3 und 4	ja	nein	0,38; 5
14.	gelb	0,41-0,45	2	ja, aber dünner und heller	nein	0,39; 2 und 3
15.	braun-rosa	0,45-0,47	2	ja	ja	
16.	schwach orange	0,47	2,3 und 4	ja	nein	0,46; 4
17.	braun-rosa	0,48	2	ja	nein	

Fraktion 3:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des schwachen Pigmentbildners vorhanden?	Fluoreszierend?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	rot-violett	0,05	3,4 und 5	ja	nein	0,05; 4 und 5
2.	intensiv-orange	0,17-0,18	2,3	ja	nein	0,14; 3 und 4; <b>Pityriarubin A</b>
3.	schwach rot	0,21	2,3 und 4	ja	nein	0,19; 3; <b>Pityrialacton</b>
4.	violett	0,26	3,4,5 und 6	ja	nein	
5.	schwach-grün-orange	0,29-0,30	3,4,5 und 6	ja	nein	0,26; 4 und 5; <b>Pityriarubin B</b>
6.	violett	0,32-0,34	2,3,4	ja	nein	0,31; 4 und 5
7.	rosa	0,35	1,2 und 3	ja	nein	0,34; 3
8.	blau-grün	0,35-0,41	2 und 3	ja	nein	0,37; 3
9.	türkis	0,41	2,3 und 4	ja	nein	0,38; 5
10.	gelb-orange	0,42	3	ja	ja	
11.	schwach-rosa	0,43-0,45	3	ja	nein	
12.	türkis	0,46-0,47	3	ja	nein	
13.	intensiv-orange	0,47	2,3,4	ja	nein	0,46; 4

Fraktion 4:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des schwachen Pigmentbildners vorhanden?	Fluoreszierend?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	rot-violett	0,06	3, 4 und 5	ja	nein	0,05; 4 und 5
2.	braun	0,07	4	nein	nein	
3.	schwach violett	0,09	4	ja	nein	
4.	schwach orange	0,09	4 und 5	ja	ja	
5.	schwach braun	0,14	4	nein	nein	
6.	intensiv-gelb	0,14-0,16	4 und 5	ja	nein	0,14; 5; <b>Pityriacitrin</b>
7.	schmutzig-blau	0,17-0,19	4	ja, viel weniger intensiv	nein	
8.	bräunlich-violett	0,21	2,3 und 4	nein	nein	0,19; 3; <b>Pityrialacton</b>
9.	schwach-türkis	0,23	4,5 und 6	ja	nein	
10.	violett-grün	0,26	4,5 und 6	ja	nein	
11.	orange	0,29	3,4,5 und 6	ja, weniger intensiv	nein	0,26; 4 und 5; <b>Pityriarubin B</b>
12.	grün-grau	0,32	4	ja	nein	
13.	intensiv-violett	0,32-0,35	2,3 und 4	ja	nein	0,31; 4 und 5
14.	braun-orange	0,36	4 und 5	ja	nein	0,38; 6
15.	intensiv-türkis	0,38-0,39	2,3 und 4	ja	nein	0,38; 5
16.	orange	0,40-0,41	4	ja	ja	
17.	schwach-rosa	0,42-0,43	4	ja	nein	
18.	hell-grün	0,45	4 und 5	ja	ja	
19.	türkis	0,46	4	ja	nein	
20.	orange	0,47	2,3,4	ja	nein	0,46; 4

Fraktion 5:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des schwachen Pigmentbildners vorhanden?	Fluoreszierend?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	blau-grau	0,06	3,4 und 5	ja	nein	0,05; 4 und 5
2.	schwach-oranger	0,09	4 und 5	ja	ja	
3.	gelb	0,15-0,16	4 und 5	ja	nein	0,14; 5; <b>Pityriacitrin</b>
4.	violett-rosa	0,18-0,19	4 und 6	ja	nein	
5.	grün-braun	0,24	4,5 und 6	ja	nein	
6.	bräunlich	0,26	4,5 und 6	ja	nein	
7.	orange	0,29	3,4,5 und 6	ja	nein	0,26; 4 und 5; <b>Pityriarubin B</b>
8.	schwach-braun	0,30	5	nein	nein	
9.	braun	0,33	5,6 und 7	nein	nein	
10.	braun-oranger	0,36	4 und 5	ja	nein	0,38; 6
11.	grün-braun	0,39	5	nein	nein	
12.	hell-grün I	0,40	5 und 6	nein	ja	
13.	intensiv-hell-grün	0,41-0,43	5	nein	nein	0,44; 6
14.	hell-grün II	0,44	5	nein	ja	
15.	schwach-gelb	0,47-0,48	5	nein	ja	
16.	schwach-rosa	0,51	5	nein	ja	
17.	schwach-gelb	0,53	5	nein	ja	

Fraktion 6:

	Farbe	Rf- Wert	In den folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des schwachen Pigmentbildners vorhanden?	Fluoreszierend?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	schwach-rosa	0,19	6 und 7	nein	nein	
2.	schwach-blau	0,24	6	nein	nein	
3.	schwach-braun	0,26	4,5 und 6	ja	nein	
4.	schwach-orange	0,29	3,4,5 und 6	ja	nein	0,26; 4 und 5; <b>Pityriarubin B</b>
5.	schwach-braun	0,33	6 und 7	nein	nein	
6.	schwach-braun	0,37	6	nein	ja	
7.	hell-grün I	0,40	5 und 6	jnein	ja	
8.	braun	0,41	6 und 7	nein	nein	
9.	schwach-gelb	0,46	6	nein	nein	
10.	rot-braun	0,48	6	nein	nein	

Fraktion 7:

1.	ganz schwach-rosa	0,19	6 und 7	nein	nein	
2.	ganz schwach grün	0,26	7	nein	nein	
3.	schwach-braun	0,33	6 und 7	nein	nein	
4.	gelblich	0,40	7	nein	ja	
5.	braun	0,41	6 und 7	nein	nein	
6.	Schwach-violett	0,46	7	nein	nein	

Zusätzliche fluoreszierende Banden, die erst unter UV-Licht sichtbar wurden und keinen obigen Farbbanden zugeordnet werden konnten (Angabe nur der mittleren Rf-Werte):

Fraktion 1:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des schwachen Pigmentbildners vorhanden?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	blau	0,03	1	ja	
2.	blau	0,09	1	ja	0,11; 1
3.	blau	0,17	1	nein	0,15; 1
4.	gelb	0,24	1	ja	0,27; 1
5.	gelb	0,43	1	ja	0,45; 1

Fraktion 2:

1.	blau-grün	0,06	2 und 3	ja	0,06; 3
2.	grün	0,47	2	nein	

Fraktion 3:

1.	blau	0,06	2 und 3	ja	0,06; 3
2.	gelb	0,15	3	nein	
3.	grün	0,53	3	nein	

Fraktion 4:

1.	orange	0,09	4	ja	
2.	orange	0,40	4	ja	
3.	grün	0,43	4 und 5	ja	
4.	blau	0,48	4	ja	
5.	grün	0,51	4	nein	

Fraktion 5:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des schwachen Pigmentbildners vorhanden?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	grün-gelb	0,35	5 und 6	nein	
2.	grün	0,43	4 und 5	ja	
3.	blau	0,45	5	ja	
4.	gelb	0,48	5	nein	
5.	gelb	0,53	5	ja	

Fraktion 6:

1.	grün-gelb	0,35	5 und 6	nein	
2.	blau	0,38	6 und 7	nein	
3.	grün	0,40	6 und 7	ja	

Fraktion 7:

1.	blau	0,38	6 und 7	nein	
2.	grün	0,40	6 und 7	ja	
3.	orange	0,42	7	nein	

**Tabelle 15:** Farbbanden und Fluorochrome des schwachen Pigmentbildners

Fraktion 2:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des starken Pigmentbildners vorhanden?	Fluoreszierend?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	grün-gelb	0,07	2	ja	ja	
2.	rosa	0.09	2	ja	nein	0,08; 3 und 2
3.	gelb	0,11	2	ja	nein	
4.	schwach-rot	0,14	2	nein	ja	0,13; 3
5.	orange-rot	0,19	2 und 3	ja	nein	0,14; 3 und 4; <b>Pityriarubin A</b>
6.	schwach orange	0,21-0,22	2	ja	ja	0,19; 3; <b>Pityrialacton</b>
7.	rosa-braun	0,27	2	ja	nein	0,24; 3
8..	gelb	0,30-0,35	2	ja	nein	
9.	violett	0,36	2,3 und 4	ja	nein	0,31; 4 und 5
10.	intensiv-rosa	0,36-0,37	2 und 3	ja	nein	0,34; 3
11.	blau	0,37-039	2 und 3	ja	nein	0,37; 3
12.	türkis	0,39	2,3 und 4	ja	nein	0,38; 5
13.	gelb	0,40	2	ja, aber dicker	nein	0,39; 2 und 3
14.	rosa-braun	0,41-0,44	2	ja	ja	
15.	schwach orange	0,45	2,3 und 4	ja	nein	0,46; 4
17.	rosa-rot	0,46	2	ja	nein	



Fraktion 3:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des starken Pigmentbildners vorhanden?	Fluoreszierend?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	rot	0,06	3 und 4	ja	nein	0,05; 4 und 5
2.	intensiv-orange	0,17-0,18	2 und 3	ja	nein	0,14; 3 und 4; <b>Pityriarubin A</b>
3.	violett	0,19	3	nein	nein	
4.	schwach rot-violett	0,21	3	ja	nein	
5.	schwach-violett	0,26	2 un3	ja	nein	
6.	grün	0,29	3	ja	nein	0,26; 4 und 5; <b>Pityriarubin B</b>
7.	gelb	0,32	3	nein	nein	
8.	violett	0,33-0,34	2,3 und 4	ja	nein	0,31; 4 und 5
9.	intensiv-rosa	0,34-0,35	2 und 3	ja	nein	0,34; 3
10.	blau-grün	0,35-0,39	2 und 3	ja	nein	0,37; 3
11.	türkis	0,39	2,3 und 4	ja	nein	0,38; 5
12.	orange	0,40-0,41	3	ja	ja	
13.	schwach-blau	0,42-0,43	3	ja	nein	
14.	schwach - rosa	0,44-0,45	3	nein	ja	
15.	türkis	0,46	3	ja	nein	
16.	intensiv-orange	0,46	2,3 und 4	ja	nein	0,46; 4

Fraktion 4:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des starken Pigmentbildners vorhanden?	Fluoreszierend?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	braun	0,06	3 und 4	ja	nein	0,05, 4 und 5
2.	violett	0,08	4	ja	nein	
3.	schwach orange	0,11	4	ja	ja	
4.	gelb	0,16-0,17	4	ja	nein	0,14; 5; <b>Pityriacitrin</b>
5.	schwach-braun	0.18-0,20	4	nein	nein	
6.	blau-violett	0,21	4	ja	nein	
7.	schwach türkis	0,22	4	ja	nein	
8.	violett-grün	0,26	4	ja	nein	
9.	intensiv-orange	0,29	3,4 und 5	ja, intensiver	nein	0,26; 4 und 5; <b>Pityriarubin B</b>
10.	grün-grau	0,31	4	ja	nein	
11.	intensiv-violett	0,32-0,36	3,4 und 5	ja	nein	0,31; 4 und 5
12.	schwach-braun-orange	0,36	4	ja	nein	0,38; 6
13.	intensiv-türkis	0,38-039	2,3 und 4	ja	nein	0,38; 5
14.	orange	0,39-0,40	4 und 5	ja	ja	
15.	schwach-rosa	0,40-0,41	4 und 5	ja	nein	
16.	hell-grün	0,42-0,44	4	ja	ja	
17.	intensiv-türkis	0,44-0,55	4	ja, aber weniger intensiv	nein	
18.	orange	0,46	2,3 und 4	ja	nein	0,46; 4

Fraktion 5:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des starken Pigmentbildners vorhanden?	Fluoreszierend?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	schwach-gelb	0,25	5	ja	nein	
2.	orange	0,33	5	ja	nein	
3.	violett	0,43	5	ja	nein	
4.	schwach-rosa	0,38	4 und 5	ja	nein	
5.	orange	0,39	4 und 5	ja	ja	

Zusätzliche fluoreszierende Banden, die erst unter UV-Licht sichtbar wurden und keinen obigen Farbbanden zugeordnet werden konnten (Angabe nur der mittleren Rf- Werte):

Fraktion 2:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden	Auch als Bande des Pigments des starken Pigmentbildners vorhanden?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	blau	0,03	2	ja	
2.	blau-grün	0,07	2	ja	0,06; 3
3.	blau	0,12	2	ja	0,11; 1
4.	gelb	0,22	2	ja	0,27; 1
5.	gelb	0,48	2	ja	0,51; 1

Fraktion 3:

1.	gelb	0,16	3	ja	
2.	orange	0,40	3	ja	
3.	grün	0,43	3	ja	
4.	blau	0,46	3	ja	
5.	gelb	0,54	3	ja	

Fraktion 4:

	Farbe	Rf- Wert	In folgenden Fraktionen vorhanden.	Auch als Bande des Pigments des starken Pigmentbildners vorhanden?	Auch als Bande des Pigments von <i>M. furfur</i> vorhanden? (Rf-Wert; Fraktion; Name der definierten Substanz)
1.	orange	0,11	4	ja	
2.	grün	0,40	4	ja	
3.	blau	0,46	4	ja	

Fraktion 5:

1.	gelb	0,40	5	nein	
2.	blau	0,43	5	ja	
3.	orange	0,48	5	nein	

**Abbildung 9:** Verteilung der physiologisch-biochemischen Parameter auf Pigment- bzw. Nicht-Pigmentbildner

1. Univariate Verteilung (1= Merkmal positiv; 0= Merkmal negativ):

Table of PIGMENT by KONSISTENZ			
Pigment	Konsistenz		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	79 37.62 62.70 66.39	47 22.38 37.30 51.65	126 60.00
1	40 <sup>1</sup> 19.05 <sup>2</sup> 47.62 <sup>3</sup> 33.61 <sup>4</sup>	44 20.95 52.38 48.35	84 40.00
Total	119 56.67	91 43.33	210 100.00

Table of PIGMENT by MANNITOL			
Pigment	Mannitol		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	79 37.62 62.70 69.30	47 22.38 37.30 48.96	126 60.00
1	35 16.67 41.67 30.70	49 23.33 58.33 51.04	84 40.00
Total	114 54.29	96 45.71	210 100.00

Table of PIGMENT by SORBITOL			
Pigment	Sorbitol		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	83 39.52 65.87 66.94	43 20.48 34.13 50.00	126 60.00
1	41 19.52 48.81 33.06	43 20.48 51.19 50.00	84 40.00
Total	124 59.05	86 40.95	210 100.00

Table of PIGMENT by SUCCINAT			
Pigment	Succinat		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	122 58.10 96.83 59.22	4 1.90 3.17 100.00	126 60.00
1	84 40.00 100.00 40.78	0 0.00 0.00 0.00	84 40.00
Total	206 98.10	4 1.90	210 100.00

<sup>1</sup> Anzahl der Stämme; <sup>2</sup> Anzahl der Stämme im Verhältnis zu allen Stämmen (in %);  
<sup>3</sup> Anzahl der Stämme im Verhältnis zu allen Pigmentbildnern (in %); <sup>4</sup> Anzahl der Stämme  
im Verhältnis zu allen Stämmen mit dieser Merkmalsausprägung (in %)

Pigment	Glycerol		Total
	0	1	
Frequency			
Percent			
Row Pct			
Col Pct			
0	2 0.95 1.59 100.00	124 59.05 98.41 59.62	126 60.00
1	0 0.00 0.00 0.00	84 40.00 100.00 40.38	84 40.00
Total	2 0.95	208 99.05	210 100.00

Die physiologisch-biochemischen Parameter Eskulin-Spaltung, Catalase-Aktivität und Glukose-Assimilation waren sowohl bei Pigmentbildnern als auch bei Nicht-Pigmentbildnern zu 100% positiv und kamen somit für ein multivariates logistisches Regressionsmodell nicht in Frage.

## 2. Multivariates logistisches Regressionsmodell:

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	-1.0286	0.2399	18.3863	<.0001
KONSIST	1	0.5358	0.2921	3.3654	0.0666
SORBITOL	1	-0.00625	0.5184	0.0001	0.9904
MANNITOL	1	0.8085	0.5155	2.4595	0.1168

Odds Ratio Estimates			
Effect	Point Estimate	95% Wald Confidence Limits	
KONSIST	1.709	0.964	3.029
SORBITOL	0.994	0.360	2.745
MANNITOL	2.244	0.817	6.165

Table of PIGMENT by KONSTELLATION									
PIGMENT	Konstellation								
Frequency Percent Row Pct Col Pct	000	001	010	011	100	101	110	111	Total
0	52 <sup>1</sup> 24.76 <sup>2</sup> 41.27 <sup>3</sup> 76.47 <sup>4</sup>	1 0.48 0.79 33.33	5 2.38 3.97 71.43	21 10.00 16.67 51.22	25 11.90 19.84 59.52	1 0.48 0.79 100.00	1 0.48 0.79 14.29	20 9.52 15.87 48.78	126 60.00
1	16 7.62 19.05 23.53	2 0.95 2.38 66.67	2 0.95 2.38 28.57	20 9.52 23.81 48.78	17 8.10 20.24 40.48	0 0.00 0.00 0.00	6 2.86 7.14 85.71	21 10.00 25.00 51.22	84 40.00
Total	68 <sup>1</sup> 32.38 <sup>2</sup>	3 1.43	7 3.33	41 19.52	42 20.00	1 0.48	7 3.33	41 19.52	210 100.00

Horizontal (Konstellation): H: Konsistenz; Z: D-Mannitol; E: D-Sorbitol

Vertikal: <sup>1</sup> Anzahl der Stämme; <sup>2</sup> Anzahl der Stämme im Verhältnis zu allen Stämmen (in %);  
<sup>3</sup> Anzahl der Stämme im Verhältnis zu allen Nicht-Pigmentbildnern (in %); <sup>4</sup> Anzahl der  
Stämme im Verhältnis zu allen Stämmen mit dieser Konstellation (in %)

**p (Nicht-Pigmentbildner / 000) = 74%**

**Abbildung 10:** Verteilung der genetischen Parameter auf Pigmentbildner bzw. Nicht-Pigmentbildner

1. Univariate Verteilungen:

Table of Pigment by 2114-1951 bp			
Pigment	2114-1951 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	32 28.07 66.67 41.03	16 14.04 33.33 44.44	48 42.11
1	46 <sup>1</sup> 40.35 <sup>2</sup> 69.70 <sup>3</sup> 58.97 <sup>4</sup>	20 17.54 30.30 55.56	66 57.89
Total	78 68.42	36 31.58	114 100.00

Table of Pigment by 1732 bp			
Pigment	1732 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	47 41.23 97.92 41.59	1 0.88 2.08 100.00	48 42.11
1	66 57.89 100.00 58.41	0 0.00 0.00 0.00	66 57.89
Total	113 99.12	1 0.88	114 100.00

Table of Pigment by 1624-1428 bp			
Pigment	1624-1428 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	21 18.42 43.75 38.18	27 23.68 56.25 45.76	48 42.11
1	34 29.82 51.52 61.82	32 28.07 48.48 54.24	66 57.89
Total	55 48.25	59 51.75	114 100.00

Table of Pigment by 1396-1358 bp			
Pigment	1396-1358 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	47 41.23 97.92 41.96	1 0.88 2.08 50.00	48 42.11
1	65 57.02 98.48 58.04	1 0.88 1.52 50.00	66 57.89
Total	112 98.25	2 1.75	114 100.00

<sup>1</sup> Anzahl der Stämme

<sup>2</sup> Anzahl der Stämme im Verhältnis zu allen Stämmen (in %)

<sup>3</sup> Anzahl der Stämme im Verhältnis zu allen Pigmentbildnern (in %)

<sup>4</sup> Anzahl der Stämme im Verhältnis zu allen Stämmen mit dieser Bandenkonstellation (in %)



Table of Pigment by 1197-1090 bp			
Pigment	1197-1090 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	0 0.00 0.00 0.00	48 42.11 100.00 48.00	48 42.11
1	14 12.28 21.21 100.00	52 45.61 78.79 52.00	66 57.89
Total	14 12.28	100 87.72	114 100.00

Table of Pigment by 1083-989 bp			
Pigment	1083-989 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	23 20.18 47.92 29.87	25 21.93 52.08 67.57	48 42.11
1	54 47.37 81.82 70.13	12 10.53 18.18 32.43	66 57.89
Total	77 67.54	37 32.46	114 100.00

Table of Pigment by 995-863 bp			
Pigment	995-863 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	38 33.33 79.17 40.86	10 8.77 20.83 47.62	48 42.11
1	55 48.25 83.33 59.14	11 9.65 16.67 52.38	66 57.89
Total	93 81.58	21 18.42	114 100.00

Table of Pigment by 860-751 bp			
Pigment	860-751 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	23 20.18 47.92 29.49	25 21.93 52.08 69.44	48 42.11
1	55 48.25 83.33 70.51	11 9.65 16.67 30.56	66 57.89
Total	78 68.42	36 31.58	114 100.00

Table of Pigment by 734-722 bp			
Pigment	734-722 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	45 39.47 93.75 40.91	3 2.63 6.25 75.00	48 42.11
1	65 57.02 98.48 59.09	1 0.88 1.52 25.00	66 57.89
Total	110 96.49	4 3.51	114 100.00

Table of Pigment by 720-651 bp			
Pigment	720-651 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	48 42.11 100.00 42.11		48 42.11
1	66 57.89 100.00 57.89		66 57.89
Total	114 100.00		114 100.00

Table of Pigment by 608-531 bp			
Pigment	608-531 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	1		
0	48 42.11 100.00 42.11		48 42.11
1	66 57.89 100.00 57.89		66 57.89
Total	114 100.00		114 100.00

Table of Pigment by 494-434 bp			
Pigment	494-434 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	1		
0	48 42.11 100.00 42.11		48 42.11
1	66 57.89 100.00 57.89		66 57.89
Total	114 100.00		114 100.00

Table of Pigment by 430-369 bp			
Pigment	430-369 bp		Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	
0	21 18.42 43.75 58.33	27 23.68 56.25 34.62	48 42.11
1	15 13.16 22.73 41.67	51 44.74 77.27 65.38	66 57.89
Total	36 31.58	78 68.42	114 100.00

## 2. Multivariates logistisches Regressionsmodell:

Analysis of Maximum Likelihood Estimates					
Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	0.9994	0.4741	4.4445	0.0350
bp399	1	1.6125	0.5770	7.8096	0.0052
bp794	1	-3.4232	0.7034	23.6876	<.0001
bp1039	1	-2.6813	0.5769	21.5985	<.0001
bp939	1	1.8530	0.7400	6.2702	0.0123

Odds Ratio Estimates			
Effect	Point Estimate	95% Wald Confidence Limits	
bp399	5.015	1.619	15.541
bp794	0.033	0.008	0.129
bp1039	0.068	0.022	0.212
bp939	6.379	1.496	27.205

Table of PIGMENT by BANDENKONSTELLATION									
Pigment	Bandenkonstellation								
Frequency Percent Row Pct Col Pct	0000	0001	0010	0011	0100	0101	0111	1001	1011
0	2 1.75 4.17 12.50	5 4.39 10.42 14.71	8 7.02 16.67 100.00	8 7.02 16.67 80.00	9 7.89 18.75 90.00	4 3.51 8.33 30.77	2 1.75 4.17 100.00	0 0.00 0.00 0.00	0 0.00 0.00 0.00
1	14 12.28 21.21 87.50	29 <sup>1</sup> 25.44 <sup>2</sup> 43.94 <sup>3</sup> 85.29 <sup>4</sup>	0 0.00 0.00 0.00	2 1.75 3.03 20.00	1 0.88 1.52 10.00	9 7.89 13.64 69.23	0 0.00 0.00 0.00	1 0.88 1.52 100.00	8 7.02 12.12 100.00
Total	16 14.04	34 <sup>1</sup> 29.82 <sup>2</sup>	8 7.02	10 8.77	10 8.77	13 11.40	2 1.75	1 0.88	8 7.02

Table of PIGMENT by BANDENKONSTELLATION				
Pigment	Bandenkonstellation			Total
Frequency Percent Row Pct Col Pct	1100	1101	1111	
0	2 1.75 4.17 100.00	1 0.88 2.08 50.00	7 6.14 14.58 87.50	48 42.11
1	0 0.00 0.00 0.00	1 0.88 1.52 50.00	1 0.88 1.52 12.50	66 57.89
Total	2 1.75	2 1.75	8 7.02	114 100.00

Horizontal (Bandenkonstellation): T: 995-863 bp; H: 1083-989 bp; Z: 860-751 bp; E: 430-369 bp

Vertikal: <sup>1</sup> Anzahl der Stämme; <sup>2</sup> Anzahl der Stämme im Verhältnis zu allen Stämmen (in %);  
<sup>3</sup> Anzahl der Stämme im Verhältnis zu allen Pigmentbildnern (in %); <sup>4</sup> Anzahl der Stämme im  
Verhältnis zu allen Stämmen mit dieser Bandenkonstellation (in %)

**p (Pigmentbildner / 0001) = 93%**

**p (Pigmentbildner / 0000) = 72%**

**Veröffentlichung:**

**Genetic and biochemical characterization of *Malassezia pachydermatis* with particular attention to pigment-producing subgroups**

**Hamid Hossain, Volker Landgraf, Reinhardt Weiß, Marion Mann, Jaleh Hayatpour, Trinad Chakraborty and Peter Mayser**

Medical Mycology (2005 Impact Factor: 1.422) February 2007, **45**, 41-49

## **9 Erklärung zur selbstständigen Anfertigung der Dissertation**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Giessen, den 21.09.2006

## **10 Lebenslauf**

Volker Friedrich Wilhelm Landgraf  
Am Bergwerkswald 15 b  
35392 Giessen

### **Persönliche Angaben**

geboren am: 14.01.1974 in Frankfurt am Main  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulischer Werdegang**

1980-1984 Grundschule Altstadt  
1984-1993 Gymnasium Nidda

### **Zivildienst**

8/1993-11/1994 Zivildienst in der Neurologischen Klinik Bad Salzhausen

### **Studium**

1995-1999 Studium der Soziologie und Psychologie an der Universität Giessen  
1999-2002 Studium der Humanmedizin an der Universität Giessen  
8/2001 Ablegen der ärztlichen Vorprüfung  
ab 2002 Studium der Zahnmedizin an der Universität Giessen  
8/2003 Ablegen der zahnärztlichen Vorprüfung  
7/2006 Ablegen der zahnärztlichen Prüfung

## **11 Danksagung**

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Mayser bedanken für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas. Er stand mir bei der Durchführung der Experimente sowie der Erstellung der Promotionsschrift stets sehr hilfreich zur Seite.

Großer Dank gebührt Dr. Hamid Hossain, der diese Arbeit mitermöglichte.

Herzlich bedanken möchte ich mich ferner bei Frau Ursula Förste, medizinisch technische Laborassistentin des mykologischen Forschungslabors, sie hat mich in äußerst wertvoller Weise in einem sehr netten Arbeitsklima unterstützt.

Frau Marion Mann sei gedankt für die statistische Beratung und Realisation.

Herrn Dr. Weiss danke ich für die Sammlung einheimischer Wildisolate.

Allen Mitdoktoranden möchte ich ebenfalls danken für ein gutes Miteinander und gegenseitige Hilfestellungen, die vieles erleichtert haben.

Nicht zuletzt möchte ich an dieser Stelle meiner Ehefrau Oxana, meinen Eltern und Schwiegereltern und meinem Bruder Rüdiger danken für ihre liebevolle Unterstützung.



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5128-9

