



Nachweis von Subtilisin 3 und 6 in Hautbiopsien von Rindern mit einer klinisch manifestierten Rindertrichophytie

Amina Barhoum, Jakob Lindenhahn¹, Wieland Schrödl¹ und Jule K. Michler²
¹ Institut für Bakteriologie und Mykologie, Universität Leipzig ² Veterinär-Anatomisches Institut, Universität Leipzig

EINLEITUNG

Trichophyton (T.) verrucosum ist ein hochpathogener, keratinophiler Dermatophyt und verursacht die Rindertrichophytie. Es sind vor allem Kälber, Färsen und immunsupprimierte Tiere betroffen. Aufgrund seines hohen zoonotischen Potentials ist die Erkrankung auch auf den Menschen übertragbar. ¹⁻⁴ Mit Hilfe von Enzymen ist der Pilz in der Lage, keratinhaltige Strukturen der Epidermis und Dermis zu verdauen. Subtilisin (Sub) 3 ist essentiell für Adhäsion der Konidien an die Wirtsepidermis, greift aber nicht in den Invasionsprozess ein. Hingegen wird Sub6 mit der Modulation des Entzündungsprozesses im Wirtsorganismus assoziiert. ⁵ Die Virulenzfaktoren Sub3 und Sub6 gelten als essentiell für die Manifestation der Infektion mit *T. verrucosum*. ⁶ Mit Hilfe von Antikörpern (gegen *Trichophyton* sp., Sub3 und Sub6) erfolgte die Untersuchung von 19 Hautbiopsien erkrankter Tiere via Immunfluoreszenzmikroskopie. Im Zentrum dieser Studie über *T. verrucosum* stand die genauere Untersuchung der Virulenzfaktoren Sub3 und Sub6 beim Rind. Im Rahmen der Untersuchungen gelang der Nachweis der Expression von Sub3 und Sub6 in allen 19 Gewebeproben *in vivo*.



Abbildung 1. A und B, das klinische Bild der Rindertrichophytie wird durch kreisrunde, haarlose, scharf abgegrenzte Hautläsionen mit Exsudationen und Krustenbildung charakterisiert. Diese befinden sich vor allem im Kopf- und Halsbereich erkrankter Tiere, können bei fortschreitender Erkrankung aber auch den ganzen Körper betreffen.

METHODEN

- jede Hautbiopsie (Formalin-fixiert, in Paraffin eingebettet) wurde mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) als auch mit der Periodic acid-Schiff Reaktion (PAS) nach Standardprotokollen angefärbt
- desweiteren wurden drei Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt: Nachweis von *Trichophyton* sp. mit der anti-T-Antikörper-Färbung und für den Nachweis von Sub3 bzw. Sub6 mit der Immuno-CARD Färbung wie in Tabelle 1 beschrieben

Schritt	anti-T-Antikörper Färbung	Immuno-CARD Färbung (Sub3/Sub6)
1. Blockschritt	Blockung von unspezifischen Bindungen 200 µl Blocklösung (100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM Ethanolamin pH 8,0, 154 mM NaCl, 5 vol% Kaninchennormals Serum) je OT; Inkubation für 1 h bei RT (dunkel)	Blockung der endogenen Peroxidase OT mit 0,3 % H ₂ O ₂ ; 0,1 % NaNa ₃ , 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) vorbehandeln; Inkubation für 1h bei RT (dunkel)
Waschen	Waschen I 2 x 0,9% NaCl/ 0,05% Tween 20, 1 x Aqua dest.	Waschen II 1 x Leitungswasser, 1 x Aqua dest.
2. Permeabilisation	entfällt	OT mit 10 mg/ml Lysozym (Merck-Charge, 50mM Tris/HCl (pH 9,0), 20mM EDTA) behandeln; Inkubation für 1h (Sub3) oder 3h (Sub6) bei 37°C (dunkel)
Waschen	entfällt	Waschen III 1 x Leitungswasser, 1 x 0,9 % NaCl + 0,05 % Tween 20, 1 x Aqua dest.
Antikörperzugabe	200 µl je Probe Antikörperzugabe (1 µg/ml IgG(Fab) ₂ -anti- <i>Trichophyton</i> konjugiert mit Fluorescein), Verdünnungslösung (100 mM Tris/HCL, pH 7,2; 154 mM NaCl; 5 vol% Kaninchennormals Serum; 0,05% Tween 20 und 0,05% Triton X100); Inkubation für 2h bei RT (dunkel)	HRP-konjugierte anti-Sub3 (anti-Sub6) Antikörper (1 µl/ml in PBS; 0,05% Tween 20 und 5 % IgG (Kaninchen)-anti-MCPA); Inkubation für 1h bei RT (dunkel)
Waschen	Waschen I entfällt	Waschen III OT mit 0,5 ml 1/1000 Amplifikationspuffer + 0,5 µl Tyramid-FITC (4 mg/ml) + 0,5 µl 0,15% H ₂ O ₂ behandeln; Inkubation für 15 min bei RT (dunkel)
Waschen	entfällt	Waschen III
Kernfärbung	Zugabe von 50 µl Hoechst Bisbenzimid 33 342 (1/1000 in PBS (Dulbecco, pH 7,35); Inkubation für 30 min bei RT (dunkel)	Zugabe von 50 µl Hoechst Bisbenzimid 33 342 (1/1000 in PBS (Dulbecco, pH 7,35); Inkubation für 30 min bei RT (dunkel)
Waschen	Waschen I	Waschen III

Tabelle 1. Protokolle für den Nachweis von *T. verrucosum* (anti-T-Antikörper Färbung) und Sub3/ Sub6 (Immuno-CARD Färbung); OT, Objektträger; RT, Raumtemperatur. Bei den aufgeführten Waschvorgängen wurden die OT 5 x durch Bechergläser (500ml) mit den jeweiligen Lösungen geschwenkt.

ERGEBNISSE I

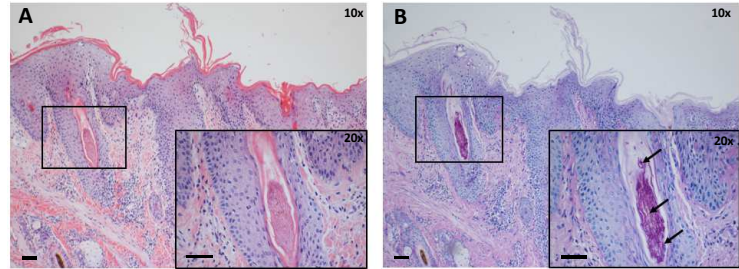


Abbildung 2. Histopathologische Untersuchung von Hautbiopsien mit *T. verrucosum* infizierter Tiere. A, Hämatoxylin und Eosin Färbung (H&E). Pilzmateriale wird wenig angefärbt. B, Die Periodic acid-Schiff Färbung (PAS) lässt Pilzmateriale von *T. verrucosum* deutlich werden. Im Gegensatz zur H&E Färbung werden die Pilzhypen von *T. verrucosum* im Haarfollikel dunkelviolett dargestellt. Verglichen mit der H&E Färbung wurden mittels PAS Färbung nur 3/19 Proben als frei von *T. verrucosum* diagnostiziert (H&E: 7/19 getestete Proben *T. verrucosum* negativ). (A,B: Balkenskala = 200 µm; Einsatz: Balkenskala = 400 µm).

ERGEBNISSE II

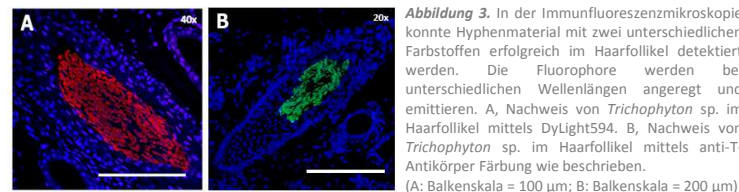


Abbildung 3. In der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte Hyphenmaterial mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen erfolgreich im Haarfollikel detektiert werden. Die Fluorophore werden bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt und emittieren. A, Nachweis von *Trichophyton* sp. im Haarfollikel mittels DyLight594. B, Nachweis von *Trichophyton* sp. im Haarfollikel mittels anti-T-Antikörper Färbung wie beschrieben. (A: Balkenskala = 100 µm; B: Balkenskala = 200 µm)

ERGEBNISSE III

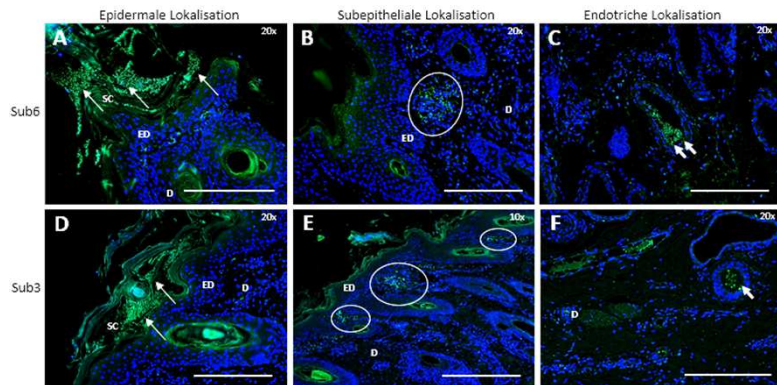


Abbildung 4. Immunfluoreszenzfärbungen für den Nachweis von Sub3 und Sub6 in infizierter Rinderhaut. Immunmarkierung von Hautbiopsien mit Anti-Sub6-Antikörper (A – C) und Anti-Sub3-Antikörper (D – F); Stratum corneum (SC), Epidermis (ED), Dermis (D). Sub3 und Sub6 konnten sowohl im SC (A, D) als auch subepithelial im Stratum papillare (B, E) und endotracheal (C, F) nachgewiesen werden. (A, B, C, D, F: Balkenskala = 200 µm; E: Balkenskala = 400 µm)

FAZIT

- anti-T-Antikörper erwiesen sich zur Detektion von *T. verrucosum* im Vergleich zur PAS-Färbung als sensitiver
- mittels Immuno-CARD Färbung gelang der Nachweis von den Endoproteasen Sub3 und von Sub6 in allen 19 Gewebeproben
- beide Endoproteasen konnten in Sporen, aber nicht in Hypen detektiert werden
- Nachweis von Sub3 positiven Sporen in den verhornten ED-Strukturen (12/19) und im Str. papillare (17/19)
- Nachweis von Sub6 haltigen Sporen im SC (7/19) und perfollikulär bzw. in den Haarfollikeln (14/19)
- Sub3 und Sub6 konnten zusätzlich endotracheal nachgewiesen werden
- entgegen der Annahme *T. verrucosum* würde zu oberflächlichen Dermatophyosen in der Epidermis führen, konnten Hypen und Sporen auch in Haarfollikeln und der Dermis detektiert werden
- Sub3 konnte *in vivo* nachgewiesen werden

1. Blank F. Ringworm of cattle due to trichophyton discoides and its transmission to man. Can J Comp Med Vet Sci. 1953; 17: 277-281.
2. Chermette R, Ferrero L, Guillot J. Dermatophytes in animals. Mycopathology. 2008; 166: 385-405.
3. Weisbach J, Gies G, Behara LC, Beringer C, Wamer ZM, Mottl PM. Occurrence of dermatomycosis (ringworm) due to *Trichophyton verrucosum* in dairy calves and its spread to animal attendants. J S Afr Vet Assoc. 1998; 69: 172-173.
4. Bond R. Superficial veterinary mycoses. Clin Dermatol. 2010; 28: 226-235.
5. Bado A, Mally A, Tabari J et al. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. Br J Dermatol. 2010; 162: 990-997.
6. Staib P, Zaugg C, Mignon B et al. Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhaimiae* *in vitro* versus during infection. Microbiology. 2010; 156: 884-895.