

PRO EXPERIMENTIS

A New Simple Method for Rapid Acquisition of Chlamydospores in *Candida albicans*

The high incidence of *Candida albicans* infections due to a large scale use of antibacterial and immunosuppressive drugs¹, requires new rapid and reliable tests for clinical diagnosis of this organism. Chlamydospores represent a morphological element of high specificity for the species *albicans*. The formation of chlamydospores, however, is inconstant, depends on many factors and requires 4–10 days long cultivation periods².

In this paper we describe a new and simple method for obtaining in a short time and in a reproducible way a large quantity of *C. albicans* chlamydospores.

In all experiments 30 strains of *C. albicans* and 20 strains belonging to other species of *Candida* were tested.

Suspensions of blastospores of *Candida* (O.D. $\frac{1\text{cm}}{560\text{nm}} = 1,0$) grown during 24 h at 37°C in a Sabouraud medium (BBL) were used throughout this study. 0.1 ml of a suspension were inseminated into 0.9 ml of the culture medium consisting of horse serum diluted with distilled water (1:2.5) containing 0.01% of soluble starch (Merck) and 0.25% of trypan blue (Fluka). The culture medium

was incubated in a water bath maintained at 37°C. The formation of chlamydospores was controlled by means of microscope after 6–8 h of incubation and eventually at 24 h after insemination. Chlamydospores formed in these conditions may give subsequently vegetative forms and therefore incubation periods longer than 24 h were not used.

Microscopical examination of morphological elements grown in a culture medium indicated above shows that chlamydospores were constantly formed only by strains of *C. albicans*. These spores were formed apically and eventually intercalary and had a typical round or irregular structure (Figures 1 and 2). Besides chlamydospores, blastospores and pseudomycelia were also found. It has to be stressed that the culture medium described above may be used for the pseudogermination test³ because pseudogermination takes place in the above indicated conditions in less than 2 h of incubation.

The culture medium described in this paper is unique in its property to allow the rapid formation of numerous chlamydospores of *C. albicans* in an extremely short period of incubation so far not reported in the relevant literature. It has to be stressed that formation of chlamydospores takes place at 37°C, the temperature considered by many authors inhibitory for this process⁴. Addition of trypan blue in a concentration 25 times higher than that used by NICKERSON⁵ facilitates microscopical examination of chlamydospores, stimulates their formation and exerts bactericidal action. The possibility of using the culture medium described in this paper for a pseudogermination test which is considered the most reliable test for the diagnosis of *C. albicans* is another of the useful features of this medium.

Riassunto. Viene descritto un nuovo e semplice metodo per ottenere in un tempo molto breve (6–8 ore) e con grande riproducibilità le clamidospore dalla *C. albicans*.

N. SIMONETTI and V. STRIPPOLI⁶

Institutes of Microbiology, University of Camerino and Rome, I-00100 Roma (Italy), 25 January 1971.

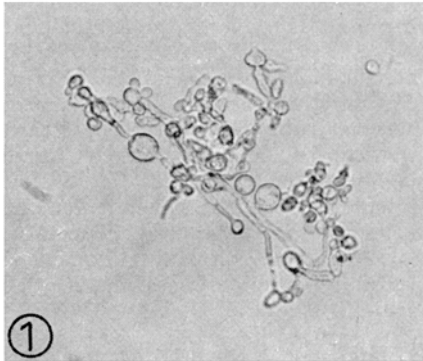


Fig. 1. Chlamydospores obtained with culture medium described in text incubated for 8 h at 37°C. Leitz Ortholux – Orthomat microscope. $\times 320$.

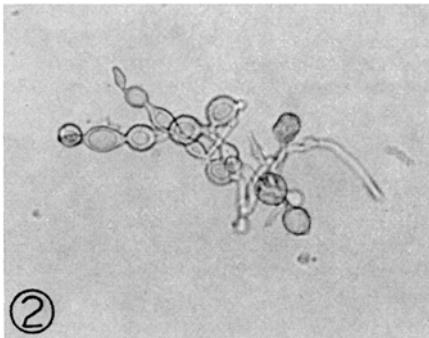


Fig. 2. The same chlamydospores. $\times 500$.

¹ M. S. SEELIG, *Bact. Rev.* 30, 442 (1966).

² D. W. R. MACKENZIE, in *Symposium on Candida infections* (Eds. H. I. WINNER and R. HURLEY; E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1966), p. 29.

³ C. L. TASCHDJIAN, J. J. BURCHALL and P. J. KOZINN, *Am. J. Dis. Child.* 99, 212 (1960).

⁴ L. WICKERHAM and L. F. RETTGER, *J. trop. Med. Hyg.* 42, 1 (1939).

⁵ W. J. NICKERSON and Z. T. MANKOWSKI, *J. infect. Dis.* 92, 20 (1953 x).

⁶ Acknowledgements. We wish to express our gratitude to Dr. V. ORTALI of the Istituto Superiore della Sanità, Rome, for supplies and classification of most of the species used in this study.

Beobachtung von Furchungsteilungen mit Chromosomen-Elimination in lebenden Embryonen der Gallmücke *Heteropeza pygmaea*

Die Gallmücke *Heteropeza pygmaea* (syn. *Oligarces paradoxus*; Cecidomyiidae syn. Itonididae; Diptera) kann sich vivipar pädogenetisch fortpflanzen^{1,2}. Dabei gelangen unbefruchtete Eier aus dem Ovar der Larve in ihre

Leibeshöhle. Dort wachsen sie zu Larven heran und schlüpfen schliesslich aus der inzwischen abgestorbenen Mutterlarve. Bei bestimmten Nahrungsbedingungen sind alle schlüpfenden Tiere weiblich^{1,2}. In diesem Fall be-

zeichnet man die Mutterlarve als Weibchenmutter. WENT⁴ gelang es 1967 erstmals, pädogenetisch sich entwickelnde Eier *in vitro* bis zu ausgewachsenen Larven aufzuziehen.

Wie alle bisher untersuchten Gallmücken weist *Heteropeza pygmaea* in Soma- und Keimbahnkernen verschiedene Chromosomenzahlen auf^{2,5-7}. Dieser Unterschied ist auf Elimination von Chromosomen aus künftigen Somakernen in frühen Furchungsteilungen zurückzuführen. Die folgende Methode gestattet es, die Eliminations-teilungen der pädogenetischen Entwicklung von *Heteropeza pygmaea* im Phasenkontrast-Mikroskop zu beobachten und zu filmen.

Methode. Die Zucht von *Heteropeza pygmaea* erfolgt nach der von ULRICH entwickelten und später modifizierten Methode^{2,7}.



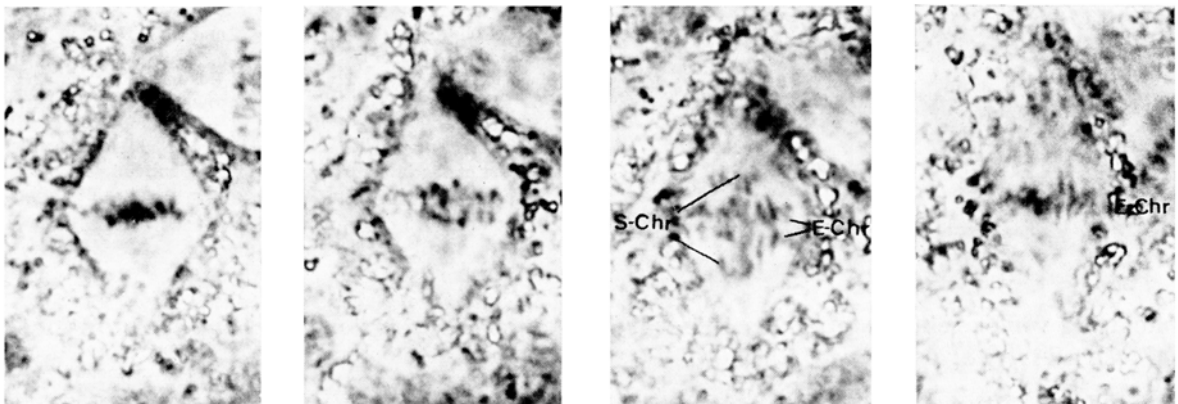
Fig. 1. Lebender Embryo mit 4 Furchungskernen. $\times 514$. Vp, Vorderpol; Hp, Hinterpol; K, Kern.

Unter der Lupe werden junge Weibchenmütter ausgewählt, die frühe Embryonalstadien enthalten. Eine einzelne Weibchenmutter wird auf ein silikoniertes Deckglas gebracht und mit soviel Paraffin subliquid bedeckt, dass sich auf dem Glas ein Tropfen von 5–7 mm Durchmesser bildet. Dann fasst man die Larve mit zwei Pinzetten an den beiden Enden derart, dass keine Fettkörperlappen eingeklemmt werden. Mit einer raschen Bewegung reißt man das Tier auf. Dabei treten die Hämolymphe, die ganzen Fettkörperlappen und die Embryonen aus und bilden im Paraffintropfen eine Kugel. Mit einer Glasnadel entfernt man die Fettkörperlappen. Es ist wichtig, dass sie vollständig und unverletzt herausgenommen werden. Darauf nähert man dem Paraffintropfen von oben einen unsilikonierten Objektträger. Sobald dieser das Paraffin berührt, wird das Deckglas durch Kapillarkräfte emporgezogen und bleibt am Objektträger haften. Bei der angegebenen Paraffinmenge ist die entstehende Schicht zwischen Objektträger und Deckglas so dünn, dass die Embryonen abgeflacht werden. Die Dottermenge ober- und unterhalb der Kerne wird dadurch verringert, und die Kernteilungen können beobachtet und gefilmt werden.

Resultate. Figur 1 zeigt einen abgeflachten Embryo mit 4 Kernen in Interphase. In der nächsten Teilung (3. Furchungsteilung) eliminieren die vorderen 3 Kerne, und nur der hinterste Kern durchläuft eine normale Mitose.

Aus Untersuchungen an gefärbten Präparaten ist bekannt, dass in Eliminationsteilungen sämtliche Chromosomen normal ausgebildet und in Tochterchromosomen gespalten werden, die alle mindestens eine kurze Anaphasenbewegung ausführen können⁶.

Im lebenden Embryo lässt sich mit dem Phasenkontrast-Mikroskop bis zur Metaphase (Figur 2) kein unterschiedliches Verhalten von Chromosomen feststellen. Meist führen alle Tochterchromosomen eine kurze Ana-



Figs. 2–5. Ausschnitt aus einem Zeitrafferfilm einer Eliminationsteilung (3. Furchungsteilung). $\times 1000$. Aufnahme bei 24°C, Dauer der Teilung von Interphase zu Interphase 90 min. E-Chr, eliminierte Chromosomen; S-Chr, nicht eliminierte (Soma-) Chromosomen. Fig. 2 0 min Fig. 3 1 min Fig. 4 3 min Fig. 5 6 min

¹ H. ULRICH, *Naturwissenschaften* 28, 569 und 586 (1940); *Verh. dt. zool. Ges.* 1962, 139.

² R. CAMENZIND, *Rev. suisse Zool.* 69, 377 (1962). *Chromosoma* (Berl.) 18, 123 (1966).

³ E. NIKOLEI, *Z. Morph. Oekol. Tiere* 50, 281 (1961).

⁴ D. WENT, *J. exp. Zool.*, im Druck (1971).

⁵ W. KAHLE, *Zoologica* 21, 1 (1908).

⁶ A. REITBERGER, *Chromosoma* 7, 391 (1940).

⁷ E. HAUSCHTECK, *Chromosoma* 13, 163 (1962).

phasenbewegung durch (Figur 3). Erst in der spätern Anaphase lassen sich Chromosomen, die eliminiert werden (E-Chromosomen), und Chromosomen, die nicht eliminiert werden (S-Chromosomen), unterscheiden (Figur 4). Die S-Chromosomen wandern mit gleichmässiger Geschwindigkeit weiter gegen die beiden Pole zu und werden in die Tochterkerne einbezogen. Die Bewegung der E-Chromosomen verlangsamt sich. In der Regel findet eine kurze Rückwanderung statt, so dass die E-Chromosomen nach einiger Zeit wieder in die Nähe der Äquatorebene gelangen (Figur 5). Später versinken sie im Dotter und sind im lebenden Embryo nicht mehr nachweisbar, während die Tochterkerne mit jetzt herabgesetzter Chromosomenzahl allmählich sichtbar werden. In unserm Stamm enthalten künftige Somakerne

nach der 3. Furchungsteilung noch 11 der insgesamt 66 Chromosomen². Später wird aus ihnen noch je 1 Chromosom eliminiert, so dass das Weibchen schliesslich 10 Chromosomen in den Somakernen besitzt.

Summary. A method was developed which allows in vivo observation of chromosome elimination in early cleavage divisions of the gall midge *Heteropeza pygmaea*.

F. BÄRLOCHER

Zoologisches Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Universitätsstrasse 2, CH-8006 Zürich (Schweiz), 21. Januar 1971.

Modification and Use of Plastic Embedding Forms in Electron Microscopy

In our department we have to embed a sizeable number of resin blocks in 1 day. The handling of the available capsules (Beem- or gelatine capsules) has certain disadvantages. During the filling with resin mixture one has to be very careful not to spill resin, which is sticky and hard to remove from tables and racks. The removal of polymerized blocks has to be done by razor blade. Minor injuries and cut fingers occur very easily. The orientation of specimens demands quite complicated techniques (e.g. modification of Beemcapsules, preparation in aluminium foils). In addition, Beemcapsules are relatively expensive. In order to improve the procedure we designed our own embedding forms, which we have called plastiracks.

A negative form is made of Polyvinylchloride. PVC does not bind to the silicone rubber mass, which comes off easily and completely after polymerization. PVC is relatively inexpensive and easy to cut to the necessary shape.

The material of the form should not bind to the resin mixtures used, it should be flexible and durable, and it should sustain heat up to 100°C. We chose therefore a silicone rubber 'Giessmasse (founding mass) 56' from Wacker-Chemie Ltd., Munich, which is thoroughly mixed with 4% (W/W) of hardener T (Wacker, Munich). The mixture has a low viscosity. It has to stand for 2–3 min to allow air bubbles to disappear. The negative form is filled with the silicone rubber mixture. The low viscosity allows

the mass to surround every sharp edge on the negative form. Polymerization occurs within 2–3 h at room temperature.

The plastirack can be filled easily with resin mixture and the specimens embedded. After polymerization slight bending allows the hard block to pop out. Plastirack B has low bridges (arrows), thus allowing the 'pie' to be broken up into slices like a chocolate bar. There is no resin residue left on plastiracks. Spilled resin can be scratched off without difficulty.

We have made plastiracks with openings corresponding to Beemcapsules. Later we modified the forms for adaptation to the different LKB specimen-holders and to different methods of oriented embedding. Form A is conventional, form B allows flat embedding and form C shortens the trimming and allows oriented embedding to a certain degree. A similar rubber mold to plastirack C has been described by ROCKWELL et al.¹ They draw similar conclusions in regard to epoxy resins. However, there is no indication about long-term use of this form.

We have used the same plastirack over 20 times. The following resin mixtures have been tested: Epon, Apon-Araldite, Maraglass, Vestopal. With the exception of

¹ A. F. ROCKWELL, P. NORTON, J. B. CAULFIELD and S. I. ROTH, *Sci. Tools* 13, 9 (1966).

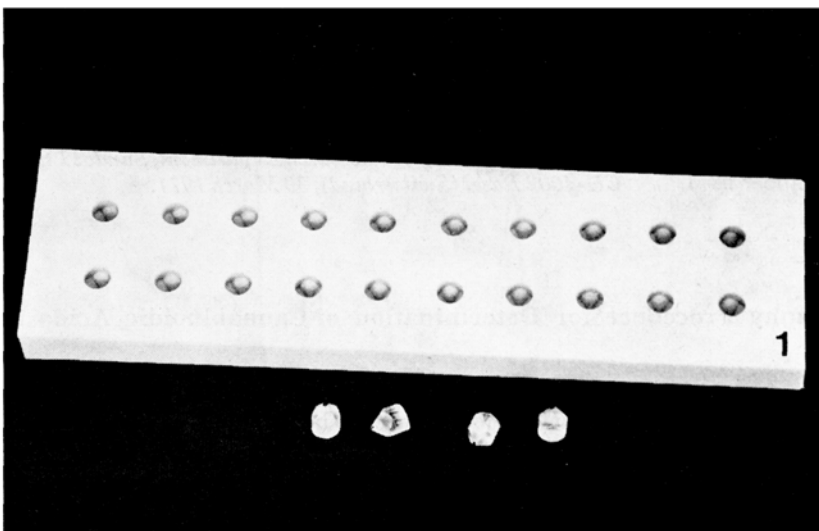


Fig. 1. Plastirack A. Conventional form for block embedding; $\frac{1}{2}$ of original size.