

## **Bericht über die 41. Jahrestagung der Arbeitsgruppe „Klinische Mykologie“ der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG)**

Michael Weig<sup>1,2</sup> und Margarete Borg-von Zepelin<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie und <sup>2</sup>Nationales Referenzzentrum für Systemische Mykosen, Kreuzberggring 57, 37075 Göttingen

<sup>3</sup>Hufeland Klinikum GmbH, Langensalzaer Landstr. 1, 99974 Mühlhausen

Die 41. Jahrestagung der Arbeitsgruppe „*Klinische Mykologie*“ der *Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft* (DMyKG) fand vom 13. bis zum 14.02.2009 am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen statt. Prof. Dr. Margarete Borg-von Zepelin (Mühlhausen) und PD Dr. med. Michael Weig (Göttingen) hatten, wie im letzten Jahr, die Leitung dieser Tagung inne. Ein inhaltlicher Schwerpunkt der Arbeitsgruppentagung wurde auf verschiedene Aspekte der mykologischen Labordiagnostik insbesondere auf den Stellenwert molekularbiologischer Verfahren gelegt. Weiterhin wurden interessante Kapitel und diskussionswürdige Fallbeiträge aus der klinischen Mykologie besprochen.

Joerg Steinmann und Peter Michael Rath (Essen) berichtete über den Nachweis pulmonaler Aspergillosen mittels SeptiFast. Das SeptiFast-System ist eine real-time PCR für den simultanen Nachweis der 25 häufigsten bakteriellen und fungalen Sepsiserreger aus Vollblut. Das Ziel der vorgestellten Studie war es, die Aussagekraft des Systems bei der Diagnose einer Sepsis bei lebertransplantierten Patienten oder Patienten nach großen abdominalen Eingriffen zu bestimmen. Dazu wurden ca. 40 Proben von etwa 30 Patienten mittels SeptiFast untersucht und mit der konventionellen Blutkultur verglichen. Dies führte zu folgenden Ergebnissen: Sensitivität, Spezifität, der positive und der negative Vorhersagewert des SeptiFast-Systems lagen bei 94,7%, 52,6%, 66,6%, und 90,9%. 25 Erreger wurden nur im SeptiFast-System detektiert, die Blutkulturen waren steril. 15 dieser Erreger konnten allerdings bei den Patienten an anderen relevanten Infektionsorten nachgewiesen werden. Bei zwei Patienten, beide mit makroskopisch auffälligem Bronchoskopie-Befund, konnte innerhalb von 6 Stunden die Diagnose einer Aspergillose gestellt werden. In beiden Patienten konnte DNA von *A. fumigatus* sowohl in der BAL wie im Vollblut nachgewiesen werden. Am nächsten bzw. übernächsten Tag konnte die molekularbiologische Diagnose durch Aspergillus-Antigen-Nachweis in BAL bzw Serum bzw. den kulturellen Nachweis von *A. fumigatus* bestätigt werden. Ein Patient

konnte zudem weiter verfolgt werden. Sieben Tage nach Therapiestart mit Voriconazol ließ sich keine *A. fumigatus*-DNA im Blut bzw. in der BAL mehr nachweisen, das Aspergillus-Antigen war deutlich abgefallen. Diese noch preliminären Daten weisen darauf hin, dass sowohl die Sepsis-Diagnostik wie auch die Diagnose einer pulmonalen Aspergillose durch das SeptiFast-System deutlich schneller möglich sein könnte, als mit den bislang zur Verfügung stehenden Methoden.

Kasuistiken aus der klinischen Mykologie wurden im Anschluss vorgestellt. Frauke Albert (Erlagen) berichtete über eine Fungämie bei einer HIV-positiven Patientin und Florian Seyfarth (Jena) über das Auftreten einer Mykose nach Nadelstichverletzung mit einem Impfstoff gegen *Trichophyton verrucosum*. Die Patientin hatte sich im Umgang mit einem Impfstoff gegen Kälberflechte an der Nadel verletzt und sich den Impfstoff dabei selbst appliziert. Bei dem Impfstoff handelte es sich um einen attenuierten Lebendimpfstoff mit Konidien von *T. verrucosum*. Nach zwei Wochen fiel im Bereich der Einstichstelle am unteren Abdomen eine ca. 2cm durchmessende, flache, schuppige und juckende Plaque auf. Bei Verdacht auf eine Dermatophytose wurde eine Pilzkultur abgenommen, die – wie vermutet – den Nachweis von *Trichophyton verrucosum* ergab. Die Diagnose konnte molekularbiologisch (ITS-Sequenzierung) und massenspektrometrisch (MALDI-TOF) verifiziert werden. Abhängig vom Medium zeigten sich unterschiedliche Kulturmorphologien auf den Agarplatten. Die Anzucht auf Dermasel-Agar ergab einen schmutziggrauen, warzigen Thallus mit kurzem, spärlich ausgeprägtem Luft-Myzelflaum und submersen Wachstum (mikroskopisches Bild: Makrokonidien, Arthrokonidien, lateral an den Hyphen ansetzende Mikrokonidien), während die Anzucht auf Sabouraud-Dextrose-Agar zur Ausbildung eines gelblich pigmentierten Thallus führte (mikroskopisches Bild: reichliche Bildung von Chlamydosporen). Die Therapie mit topischem Ciclopiroxolamin führte erst nach 2 Monaten zur kompletten Abheilung des Befundes. Dies ist nach Lage der Literatur der erste Nachweis einer Infektion mit *T. verrucosum* durch Kontakt mit dem attenuierten Lebendimpfstoff gegen Kälberflechte beim Menschen.

Sabine Sennhenn-Kirchner (Göttingen) stellte ein *Candida albicans* Biofilm-Modell in der Zahnmedizin vor und berichtete über Ergebnisse zur Effektivität von Dekontaminationsverfahren. Die Kontamination oraler Oberflächen erfolgt dabei in Form von Biofilmen, wobei sich verschiedene Mikroorganismen in Mikrokolonien aus

Keimen unter einer organischen Matrix ansiedeln. In der Zahnmedizin werden neben den natürlichen intraoralen Oberflächen auch Fremdmaterialien wie Zahnersatz und zahnärztliche Implantate besiedelt. Periimplantäre Infektionen sind ursächlich mit persistierenden mikrobiellen Biofilmen verbunden, verlaufen unbehandelt progredient und führen vielfach zum Verlust des betroffenen Implantates. Von besonderem Interesse ist hierbei *C. albicans*, da der Pilz im Biofilm besonders widerstandsfähig gegen externe Einflüsse ist. Im Mundbereich werden Infektionen mit Pilzen, die in Biofilmen organisiert sind, zumeist auf Schleimhäuten beobachtet. Jedoch werden intraoral auch fremdkörperassoziierte *Candida* Infektionen beschrieben. In periimplantären Taschen sind neben parodontopathogenen Spezies und Kokken auch Hefen nachgewiesen worden. In einem *in-vitro* Biofilmmodell wurde die Wirksamkeit verschiedener, u.a. auch in der Therapie von periimplantären Infektionen eingesetzter Antiseptika einerseits (Octenisept®, Chlorhexidin 0.12%, Listerine® und Zitronensäure (20%)) im Verhältnis zu dem Antimykotikum Amphotericin B, und im Vergleich von zwei dentalen Lasern andererseits (Diodenlaser 810 nm, 1 Watt im Dauerstrahl-Modus und Er:YAG Laser 2940 nm, 100 mJ, 10 Hz, 300 µs im gepulsten Modus) auf *C. albicans* an diesem Modell evaluiert. Wenn auch alle untersuchten Antiseptika signifikante Dekontaminationsraten im Vergleich zu Kontrollen aufwiesen, so war den bisherigen Untersuchungsergebnissen zufolge der Er:YAG Laser allen anderen evaluierten Dekontaminationsmaßnahmen überlegen. Weitere Untersuchungen, speziell auch zur Rekolonisierung der dekontaminierten Oberflächen mit Osteoblasten, werden derzeit durchgeführt.

Silvia Schauder (Göttingen) berichtete mit einer Reihe eindrucksvoller klinischer Bilder über die Kandidose der Haut und der Schleimhaut. Infektionen mit *Candida*-Spezies, meistens *C. albicans*, sind häufig. *Candida*-pilze sind weltweit verbreitet und kommen als Teil der normalen Flora des Oropharynx, des oberen Respirations-, des Verdauungs- (20- 90 %) und des weiblichen Genitaltraktes (30 % bei Schwangeren) vor. Die Haut ist normalerweise frei oder nur passager besiedelt (Finger, Beugen). Krankheitswert bekommt die Hefe, wenn sie in die pathogene Myzelform übergeht. Beim Gesunden sind solche Infektionen selten, bei Patienten mit prädisponierender Vorerkrankung häufig (very young, very old, very sick). Begünstigend sind systemische Faktoren wie Defizienz der zellulären Immunabwehr (physiologisch: Neugeborene, Greise, angeboren: Immunmangelsyndrome, erworben: HIV,

Lymphome, Leukämien, Immunsuppressiva, Chemotherapie, Neutropenie), Stoffwechselstörungen (Diabetes mellitus, Hyperalimentation, Marasmus und konsumierenden Erkrankungen), Medikamente (Östrogene, Kortikosteroide, Antibiotika) und Schwangerschaft. Lokal begünstigend wirken an der Haut: Mazeration, Intertrigo, Balanitis, selten gewechselte Windeln, Okklusivverbände, berufsbedingte Durchfeuchtung (Gastgewerbe, Pfleger) und an der Schleimhaut: Zahnprothesen, Intrauterinpressare und Koitus. Demonstriert wurden ausgewählte Krankheitsbilder wie Candidosis intertriginosa, Candidosis genito-glutealis infantum, Candidosis interdigitalis, Candida Paronychie, Folliculitis candidomycetica, Genitalkandidose und chronische mucocutane Candidose. Ziel der diagnostischen Prozeduren sollte immer die Differenzierung der Spezies sein. Im Hinblick auf die Resistenz einiger Candida-Arten gegenüber Antimykotika ist allein die klinische Feststellung einer Candidose unzureichend. Die Behandlung der Haut- und Schleimhautkandidose erfolgt nach Therapie der Grundkrankheit bzw. der Realisationsfaktoren im Allgemeinen topisch, wobei Polyen-Antimykotika unvermindert wirksam sind. In Frage kommen Nystatin und Amphotericin B. Je nach Hautzustand sind die geeigneten Vehikel, insbesondere Pasten oder Cremes, auszuwählen. Auch Imidazol-Antimykotika, wie z. B. Clotrimazol und das Hydroxypyridon Ciclopiroxolamin, sind in entsprechenden Darreichungsformen geeignet. Die Therapie der chronischen mucocutanen Candidose ist äußerst problematisch und bringt oft nur temporäre Remissionen. Das therapeutische Ziel müsste die Beseitigung des Immundefektes sein. Die Behebung angeborener Immundefekte ist in einigen Fällen durch Knochenmarktransplantation gelungen.

Kathrin Tintelnot (Berlin) stellte den aktuellen Stand der Identifizierung innerhalb der Pilz-Gattungen *Pseudallescheria* und *Scedosporium* vor. Mit Hilfe eines Identifizierungsschlüssels phänotypischer Merkmale ist eine grob orientierende Identifizierung möglich, zur Absicherung sind jedoch molekularbiologische Methoden unverzichtbar. Bei entsprechenden klinischen Angaben besteht zurzeit das Angebot des Konsiliarlabors für *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium* sp. zur kostenlosen Identifizierung klinischer Isolate. Zur besseren Beurteilung der klinischen Relevanz von Isolaten dieser Erreger-Gruppe aus dem Respirationstrakt von Mukoviszidose-Patienten wurde ein entsprechendes Netzwerk gegründet. Des Weiteren wurden zwei neue Erhebungen der European Confederation of Medical Mycology (ECMM) zur Fusariose und Kokzidioidomykose vorgestellt.

Silke Schüttrumpf (Göttingen) gab einen Überblick über das Spannungsfeld der antimykotischen Therapie zwischen Diagnostik und Klinik aus internistischer Sicht. Im Laufe der letzten Jahre wurde die antimykotische Therapie durch die Einführung klinisch deutlich besser verträglicher Präparate weiterentwickelt. Bei einer unverändert hohen Mortalität von immunsupprimierten hämatologischen Patienten an nachgewiesenen Pilzinfektionen, ist ein frühzeitiger Therapiebeginn zu empfehlen. Hierzu wurden verschiedene Therapiekonzepte von der antimykotischen Prophylaxe, der empirischen sowie prä-emptiven Therapie in Studien entwickelt. Studien mit allogenen transplantierten Patienten unter Fluconazol-Prophylaxe haben bereits vor einigen Jahren einen Überlebensvorteil zeigen können. Eine im letzten Jahr veröffentlichte Studie (Cornely et al., NEJM 2007) konnte diesen Vorteil sowie eine signifikante Verminderung von Durchbruchinfektionen auch bei Patienten mit AML/MDS in der Induktionstherapie bei Durchführung einer Posaconazol-Prophylaxe bestätigen. Bei genereller Anwendung einer Prophylaxe sollte man jedoch die Überbehandlung eines Großteils der Patienten, Probleme in der Erregerdiagnostik sowie mögliche Nebenwirkungen beachten. Weiterhin ist die Möglichkeit einer Resistenzentwicklung und der ökonomische Aspekt mit in Betracht zu ziehen. Eine alternative Behandlungsmethode sowie bisheriger Standard stellt die empirische Therapie mit Zulassung von liposomalem Amphotericin B sowie Caspofungin in dieser Indikation dar. Dies bedeutet, dass die antimykotische Therapie bei persistierendem unklarem Fieber (>72h) ohne Erregernachweis bei neutropenischen Patienten begonnen wird. Hierdurch konnte die mit Pilzinfektionen assoziierte Morbidität und Mortalität deutlich gesenkt und der Anteil an Durchbruchinfektionen reduziert werden. Der Nachteil besteht auch hier in der Überbehandlung von Patienten und den therapiebedingten Nebenwirkungen. Theoretisch am sinnvollsten wäre die Behandlung von wahrscheinlichen oder möglichen Pilzinfektionen (EORTC-Kriterien) im Sinne einer prä-emptiven Therapie. Leider ist die Sensitivität der mikrobiologischen und radiologischen Diagnostik jedoch häufig gering, und Untersuchungen im Rahmen größerer randomisierter Studien stehen noch aus. Somit ist aktuell in Abhängigkeit der Inzidenz von Pilzinfektionen am behandelnden Zentrum sowie Risikoprofil des einzelnen Patienten eine Prophylaxe oder empirische Therapie als Standard zu betrachten

Michael Weig (Göttingen) stellte eine Projektskizze über Aspekte der Bedeutung von *Candida*-Hefen in Blutkulturen vor. Neben mikrobiologischen Daten

zur Epidemiologie und Resistenzentwicklung von Hefen, die aus Blutkulturen isoliert wurden, sollen durch eine systematische Erfassung klinischer Parameter die Schwere der Grunderkrankung der Patienten und auch Infektionszeichen in die Untersuchungen einbezogen werden. Dies wird durch den „New Simplified Acute Physiology Score“ (SAPSII) und den „Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) score“ umgesetzt. Durch diese Analysen lassen sich Fragen über den Einfluss der systemischen Kandidose auf Krankheitsverlauf und Mortalität bei unterschiedlichen Patientengruppen darstellen. Daran anschließend wurden vielschichtige Aspekte zum Nachweis und zur Häufigkeit von Hefen in Blutkulturuntersuchungen von Wolfgang Fegeler (Münster) beleuchtet.

Seit dem Juli 2004 werden epidemiologische Daten zur Kandidämie in Deutschland vom *Nationalen Referenzzentrum für Systemische Mykosen* in Göttingen erhoben. Margarete Borg-von Zepelin (Göttingen) stellte ausgewählte Aspekte zur Epidemiologie von Candida-Infektionen in Deutschland dar. An dieser Studie nehmen mittlerweile 63 deutsche Labore teil. Das Spektrum der eingegangenen Pilzspezies aus primär sterilen Materialien hat sich in den letzten Jahren in der Gesamtübersicht nur wenig verändert. *C. albicans* wird am häufigsten isoliert, gefolgt von *C. glabrata*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis*. Werden jedoch ausgewählte Labore aus dem universitären und nicht-universitären Bereich getrennt betrachtet, so werden deutlich unterschiedliche Spektren beobachtet. Die Resistenzlage gegenüber den Azolen ist in Deutschland nach wie vor relativ günstig. Eine erste Analyse der resistenten Isolate im Hinblick auf das Candida-Spektrum zeigte, dass resistente 5-FC Isolate vornehmlich bei der Spezies *C. tropicalis* beobachtet wurden, was im Vergleich mit der Literatur ein spezifisches deutsches Problem darstellen mag. Fluconazol-resistente Isolate treten vornehmlich bei der Spezies *C. glabrata* auf, die Fluconazol-Resistenz gegenüber der Spezies *C. albicans* ist über die letzten Jahre hinweg stabil niedrig gewesen. Es wurde weiterhin eine Analyse der Verteilung der einzelnen Pilzisolate im Bereich der getesteten Antimykotika-Konzentrationen durchgeführt, was die gute Azol-Empfindlichkeit untermauert.

Martin Kuhns und Oliver Bader (Göttingen) berichteten über ihre Forschung im Rahmen des europäischen EURESFUN Konsortiums zum Beitrag verschiedener Mechanismen zur Azolresistenz klinischer *C. albicans* und *C. glabrata* Isolate. Beide Organismen generieren gesteigerte Azoltoleranz hauptsächlich über ATP-

getriebenen Efflux. Bei *C. albicans* überlagern sich diese Effekte mit Veränderungen in der Ergosterolbiosynthese. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass Mutationen im ERG3 Gen zu vollständiger Resistenz gegenüber Fluconazol und Voriconazol führen können. Solche Veränderungen tragen aufgrund der Abreicherung von Ergosterol in der Plasmamembran gleichzeitig auch zu erhöhter Toleranz gegenüber Polyenen bei.

Es folgten Vorträge zum Thema Pathogen und Wirt. Wolfgang Bohne (Göttingen) gab eine Übersicht über Mikrosporidien. Diese Organismen sind hochspezialisierte intrazelluläre Pilze, die insbesondere als Infektionserreger bei immunsuprimierten Patienten von Bedeutung sind. Mikrosporidien haben einen einzigartigen Invasionsmechanismus entwickelt, bei dem ein Hohltubulus, das so genannte „polare Filament“ aus der Spore geschleudert wird und nachfolgend das Sporoplasma in die Wirtszelle injiziert wird. Im Modelorganismus *Encephalitozoon cuniculi* erfolgt die anschließende Entwicklung innerhalb einer parasitophoren Vakuole (PV). Um die intrazelluläre Überlebensstrategie von *E. cuniculi* besser zu verstehen, wurde die Herkunft der PV-Membran sowie Transportprozesse durch die PV untersucht. Durch Mikroinjektion fluoreszierender Farbstoffe konnte gezeigt werden, dass die PV-Membran Poren mit einer Ausschlussgröße von 3-10 kDa besitzt, die einen Metabolitaustausch ermöglichen. Es konnte außerdem mit Hilfe von Time-lapse Videomikroskopie an Wirtszellen mit fluoreszenzmarkierter Plasmamembranen nachgewiesen werden, dass die während der Infektion entstehende PV-Membran von der Wirtszelle und nicht von *E. cuniculi* stammt. Im Gegensatz zu anderen Pathogenen ist dies bei *E. cuniculi* keine Selbstverständlichkeit, da der auf eine Injektion des Sporoplasmas basierende Infektionsmechanismus sich deutlich von dem Infektionsmodus anderer Pathogene unterscheidet.

Axel Brakhage (Jena) berichtete über neueste Entwicklungen zur Aufklärung von Virulenzdeterminanten von *Aspergillus fumigatus*. Es häufen sich die Befunde, dass die Pathogenität von *A. fumigatus* eine multifaktorielle Basis besitzt. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Biosynthese des Sporenpigments, welches aus Dihydroxynaphthol-Melanin besteht. Die Biosynthese ist essentiell für die Virulenz. Es ist noch ungeklärt, ob dafür ein Derivat eines Zwischenprodukts der Biosynthese wichtig ist, welches immunsupprimierend wirkt, oder ob die Melaninschicht in den Sporen für die Fixierung von Virulenzdeterminanten auf der Oberfläche essentiell ist. A. Brakhage berichtete weiter über die Entdeckung eines zweiten

Melaninbiosynthesewegs in *A. fumigatus*, welcher zur Bildung von Pyomelanin führt, wenn Tyrosin im Medium vorhanden wird. Gene dieses Biosynthesewegs werden auch während einer Infektion in der Maus exprimiert, so dass dieses zweite Melanin möglicherweise auch eine Rolle bei der Infektion spielt. Weiterhin haben neue Untersuchungen gezeigt, dass neutrophile Granulozyten bei Koinkubation mit *A. fumigatus* „Neutrophil Extracellular Traps (NETs)“ bilden. Diese Netzstrukturen sind vermutlich für die Eindämmung der Infektion von Bedeutung.

Reinhardt Rüchel (Göttingen) gab einen Bericht über die serologische Candida-Diagnostik und stellte den Vergleich von drei verschiedenen Antigentests vor. Dabei wurden 328 Patientenserumproben den drei zurzeit verfügbaren konfektionierten *Candida*-Antigentests unterworfen. Die Seren stammten einerseits von 50 hämatologischen Patienten, von denen 14 „proven cases“ im Sinne der EORTC-Kriterien waren. Andere entstammten wahrscheinlichen oder möglichen Kandidose-Patienten. - Eine zweite Gruppe von Risikopatienten umfasste 82 konsekutive Individuen von der hiesigen bauchchirurgischen Intensivstation, die nach denselben Kriterien eingeteilt wurden. Bei den verwendeten Tests handelte es sich um den seit den 80er Jahren eingesetzten Latex-Agglutinationstest der Firma Ramco (hierzulande vertrieben durch Biermann, Bad Nauheim), sowie die Enzymimmuntests der Firmen BioRad (München) und Virion-Serion (Würzburg). Ersterer ist als Platelia-Candida Test seit rund 10 Jahren verfügbar, während Letzterer seit ca. 5 Jahren bezogen werden kann. Der genannte Latex-Test (auch bekannt als CandTec) ist von verschiedenen Autoren wegen geringer Sensitivität und Spezifität kritisiert worden. Dabei spielt eine Rolle, dass sein Zielantigen nie genauer charakterisiert wurde. Außerdem wurde kürzlich über häufig auftretende Immunreaktionen gegen Polystyrol (Latex)-Partikel selbst berichtet, die zu falsch positiven Ergebnissen führen. Bessere Ergebnisse lassen sich mit den ELISAs erzielen, die dem Nachweis von Mannan aus der Pilzzellwand dienen. Der Platelia-Test stützt sich dabei auf monoklonale Antikörper von der Ratte, während der Virion-Test mit polyklonalen Antikörpern vom Kaninchen arbeitet. Dabei handelt es sich vermutlich um ein Gemisch von monospezifischen Seren von isogenen Tieren. Die etwas bessere Sensitivität und Spezifität des Virion-Tests beruht auf dieser Polyvalenz, während beim Platelia-Test antikörper-bedingte Schwächen bei *C. krusei* und *C. parapsilosis* vorliegen, die schon früher von Rimek et al. beobachtet wurden. Nach Stevens drückt sich der

Nutzen einer derartigen Kandidose-Diagnostik in ihrer negativen Voraussage aus. Dieser negative Voraussagewert erreichte beim Virion-Test über 98 %.

Nico Vogt und Oliver Bader (Frankfurt, Göttingen) aus der Arbeitsgruppe von Michael Weig zeigten Ergebnisse einer Analyse über rekombinante Antigene im Hinblick auf die Serodiagnostik von Kandidosen. Eine frühe Diagnose ermöglicht dabei eine wirkungsvolle Therapie. Invasive Mykosen äußern sich selten mit typischen Symptomen, so dass die Diagnosestellung ein komplexer und mitunter fehlerhafter Prozess ist. Die Diagnose der Kandidose erfordert neben der Erhebung klinischer Daten am Patienten auch den Nachweis des Erregers. Neben der zeitaufwendigen Anzucht von *Candida* aus normalerweise sterilem Patientenmaterial stehen dafür auch indirekte Methoden zur Verfügung. Um die Spezifität der serologischen Nachweismethoden zu verbessern, wurden in der vorgestellten Studie verschiedene rekombinante Antigene erzeugt und getestet. Das Ziel der Studie ist ein einfacher Nachweis mit einer begrenzten Anzahl definierter Antigene, der hinsichtlich der Spezifität gegenüber invasiven Kandidosen besser als das derzeitige serologische Verfahren bei gleicher Sensitivität sein sollte. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit verschiedene *Candida* Spezies (z.B. *C. albicans* und *C. glabrata*) mit den verwendeten Antigenen erfasst werden können. Für den Nachweis von gegen *Candida* gerichteten Antikörpern aus Patienten wurden oberflächenassoziierte oder sekretorische Proteine aus *C. albicans* und *C. glabrata* ausgewählt. Neben 26 vorhandenen Expressionskonstrukten aus früheren Studien (Bader et al. BMC Microbiol, 2008; Weig, unpublizierte Daten) wurden 13 weitere Konstrukte neu kloniert, welche eine differentielle Expression zwischen Hyphen und Hefen zeigten oder in früheren Studien beschrieben waren. Die als Antigene eingesetzten Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie rekombinant aus *E. coli* gewonnen. Zunächst wurden drei positive Seren aus der Diagnostik sowie zwei Blutspenderpools zu je acht Seren ausgewählt. Western-Blots wurden gegen IgA, IgG und IgM sondiert, wobei ein IgG-Signal häufiger auftrat als IgA und IgM. Antigene, für die mindestens zwei der drei positiven Seren im Westernblot ein IgG-Signal zeigten, während die Blutspenderpools keine vergleichbaren Signale ergaben, wurden im Anschluss mittels ELISA evaluiert. Für die Evaluation wurden Seren von Patienten mit einer für Hefen positiven Blutkultur ausgewählt. Es wurden Prä-Seren, wenn möglich vor einer weiteren, negativen Blutkultur sowie Seren zu mehreren Zeitpunkten nach der positiven Blutkultur verwendet. Insgesamt wurden 109 Seren in

Verläufen von 21 Patienten, von denen 15 *C. albicans*, 5 *C. glabrata* und 1 *C. tropicalis* Infektionen aufwiesen, betrachtet. Von diesen wurden 70 auf Reaktivität gegenüber *C. albicans* und *C. glabrata* Antigene getestet. Des Weiteren stand eine Auswahl von 80 Blutspendensereren (Weig, unpublizierte Daten) als Negativkontrolle zur Verfügung. Im Vergleich zu den bereits beschriebenen Antigenen Rbt4, Bgl2 und Eno1 wurden vier weitere (3 *C. albicans*, 1 *C. glabrata*) als für eine Diagnose geeignet eingestuft. Eine Spezies-Differenzierung konnte mit den gewählten Antigenen nicht erfolgen, die Antigene eignen sich gleichermaßen zum Nachweis der drei *Candida*-Spezies. Zellwand-Proteine zeigten neben deutlich höheren Messwerten im ELISA auch bei mehreren Patienten eine Immunantwort als die löslichen Proteine Bgl2 oder Eno1. In der Studie wurde festgestellt, dass die IgA-Antwort signifikant schneller als die IgG-Antwort ist und bei IgA deutlich geringere Messwerte bei dem überwiegenden Teil der Blutspender gefunden wurden, so dass die Summe von relativer Sensitivität und Spezifität bei IgA höher als bei IgG lag. Für immunkompetente Patienten könnte eine Kombination einiger der getesteten Zellwandantigene eine schnelle und relativ verlässliche Diagnose stellen.

Utz Reichard (Göttingen) präsentierte Ergebnisse seines Labors in Zusammenarbeit mit Michel Monod (Lausanne) und Abdul R. Asif (Göttingen) bezüglich einer Antigenanalyse bei invasiver Aspergillose. Mit Hilfe eines Kaninchen-Infektionsmodells und Immunblotverfahren von 2D-Gelen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse reagierender Spots, wurden zahlreiche Antigene identifiziert, welche während einer invasiven Aspergillose vom Immunsystem neu erkannt werden. Besonders auffällig wurden hierbei solche Proteine gefunden, welche nahe legen, dass der Pilz während des Wachstums im Körper einem massiven oxidativen Stress ausgesetzt ist.

Den Auftakt zum dem nachfolgenden Workshop zur molekularen Diagnostik in der Mykologie bildete der Übersichtsvortrag von Raimund Lugert (Göttingen) zum Thema Pilz-PCR in der Routinediagnostik. Molekularbiologische Untersuchungsverfahren, insbesondere die PCR, nehmen im Rahmen der mikrobiologischen Diagnostik einen zunehmend größeren Raum ein. Der molekularbiologische Nachweis fungaler DNA wird hierbei jedoch durch ausgesprochen stabile Zellwandstrukturen erschwert, die komplexe Aufschlussverfahren zur Freisetzung genomischer DNA erforderlich machen. Mechanische Lyseverfahren liefern hierbei nur einen unvollständigen Zellaufschluß

und sind somit für routinediagnostische Anwendungen ungeeignet. Im Gegensatz hierzu zeigen thermisch/emzymatische Methoden eine für diagnostische Zwecke geeignete Freisetzung des genomischen Materials, wenngleich sie mit erheblichem Zeitaufwand verbunden sind. Zur Amplifikation fungaler DNA stehen neben panfungalen Primern, die eine große Speziesbreite abdecken, auch gattungsspezifische Primer zur Verfügung. Vor allem beim Einsatz panfungaler Primer sind Aufarbeitungs- und PCR-Kontrollen zur Detektion möglicher Kontaminationen unerlässlich. Am Beispiel einer speziesspezifischen PCR zur Diagnostik von *P. jirovecii* ist die Vorgehensweise zur Etablierung eines Tests exemplarisch gezeigt: Amplifikation des spezifischen PCR-Produktes aus positiven Patientenmaterial, Klonierung des PCR-Produktes in einen Plasmidvektor und Titration der Plasmidmenge entsprechend einer definierten Anzahl von Genomäquivalenten. Im Praxistest auf klinischen Materialien muss anschließend Spezifität und Sensitivität des Testsystems überprüft werden.

In der Schlussdiskussion wurde die zukünftige Form und die Inhalte der AG „Klinische Mykologie“ der DMykG besprochen. Weiterhin soll genügend Zeit für die Diskussion der einzelnen Beiträge aus der klinischen Mykologie eingeplant werden. Diese Möglichkeit wurde von den Teilnehmern als sehr positiv beschrieben. Für die Zukunft wurde außerdem angedacht Workshops zu etablieren, in denen spezifische mykologische Themen zur Diagnostik und Therapie besprochen und Lösungswege gemeinsam erarbeitet werden. Die Arbeitstagung wurde mit 9 Fortbildungspunkten akkreditiert und freundlicherweise durch die Fa. Pfizer unterstützt. Die nächste Arbeitsgruppentagung „Klinische Mykologie“ der DMykG wird am 12. – 13. Februar 2010 am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin in Göttingen stattfinden. Hierzu sind alle an der klinischen Mykologie interessierten Kolleginnen und Kollegen herzlich eingeladen.

PD Dr. med. Michael Weig

Prof. Dr. Margarete Borg-von Zepelin

Kontakt:

PD Dr. med. Michael Weig

Tel.: 0551-397099

E-mail: mweig@gwdg.de

Prof. Dr. Margarete Borg-von Zepelin

Tel.: 03601-411827

E-mail: [m.borg@hufeland.de](mailto:m.borg@hufeland.de)