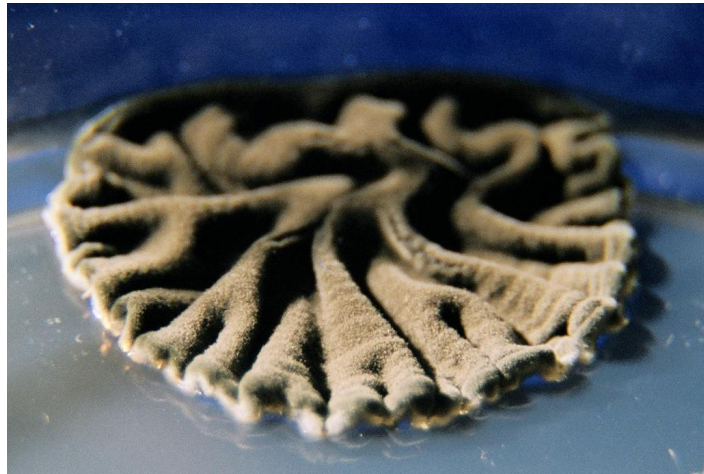


Cladosporium cf.

Kontamination/“Anflugkeim“, Kolonie auf Sabouraud 4 %-Glukose-Agar



16. Tagung der Arbeitsgemeinschaft „Mykologische Laboratoriumsdiagnostik“
Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft (DMykG)
Leipzig, 5. November 2004

Pietro Nenoff, Laboratorium für medizinische Mikrobiologie, Mölbis
Jan C. Simon, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Universitätsklinikum Leipzig

***Penicillium marneffe* sowie Zygomycosen: Aktuelle Aspekte der Labordiagnostik**

Reinhard Kappe¹ und Dagmar Rimek²

¹Haema Institut für Labormedizin am Helios Klinikum Erfurt

²Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Dezernat Medizinische Mikrobiologie, Erfurt

Penicillium marneffe

Hintergrund. *Penicillium (P.) marneffe* ist die einzige fakultativ humanpathogene und dimorphe Art der Gattung *Penicillium*. Sie kommt endemisch in Südostasien, vor allem in Thailand und Südchina in Bambusratten vor (1). Heute ist die *P. marneffe*-Infektion in Nordthailand die dritthäufigste opportunistische Infektion bei HIV-Patienten.

Labordiagnostik. Die Diagnostik der Erkrankung erfolgt durch mikroskopischen und kulturellen Nachweis von *P. marneffei* aus Blutkulturen, Sputum, Lymphknoten-, Haut- oder Knochenmarkbiopsien. Im Gewebe finden sich intrazellulär einzeln gelagerte, nicht-sprossende, rund-ovale hefeähnliche Zellen von 2 bis 5 µm Durchmesser. Extrazellulär sind zusätzlich längliche, wurstförmige Zellen bis 8 µm Länge nachweisbar. Die Pilzzellen lassen sich mittels Methenamin-Silberfärbung nach Grocott-Gomori (GMS), Perjodsäure-Schiff oder Calcofluorweiß gut anfärben. Einzelne Zellen weisen typischerweise ein bei Querteilung entstandenes Septum auf. Differentialdiagnostisch erlaubt vor allem die Morphologie der extrazellulären Formen eine Abgrenzung gegenüber *Histoplasma capsulatum*, Leishmanien sowie *Toxoplasma gondii* (Abb. 1). Der Pilz wächst in 3-7 Tagen bei 37°C in hefeähnlichen Kolonien, bei 28°C wachsen flache Kolonien mit wenig weißlichem Luftmyzel und überwiegend submerser Myzelbildung. In den Agar wird ein diffundierendes rotes Pigment abgegeben (Abb. 2). Der mikroskopische Aufbau der Pinsel-Nebenfruchtformen zeigt kriechende oder gebündelte Konidiophoren, 3-5 Metulae, 4-7 Phialiden, kurze, ungeordnete Ketten glattwandiger, elliptischer Konidiosporen.

Spezifische Antigen- und Antikörpernachweise sind in Entwicklung (2). Der Platelia® *Aspergillus*-Antigen Enzym-Immuno-Assay (BioRad, München) kreuzreagiert mit *Penicillium*-Antigen und kann zur Diagnostik und Therapieüberwachung von *P. marneffei*-Infektionen herangezogen werden (3).

Molekulare Diagnostik: *P. marneffei*-Infektionen sind mittels PCR-Assay diagnostizierbar. Mehrere Primer und Sonden wurden publiziert (2).

Zygomycosen.

Hintergrund. Die Zygomycota sind neben den Ascomycota, Basidiomycota und Chytridiomycota eine von vier Abteilungen der Eumycota. Zygomycosen sind seltene, weltweit vorkommende, rhinocerebrale, pulmonale oder viszerale invasive Mykosen. In mehr als 80 % der Fälle ist *Rhizopus oryzae* der Erreger (4).

Labordiagnostik. Die Diagnose von Zygomycosen erfolgt in der Mehrzahl der Fälle histologisch. Im Gewebe finden sich unseptierte Myzelien unterschiedlichen Kalibers (3-10 µm) mit rechtwinkligen Verzweigungen. Die Myzelien lassen sich mittels GMS oder Calcofluorweiß gut anfärben. Reinkulturen der fakultativ humanpathogenen Zygomyceten wachsen auf Sabouraud-Glukose-Agar oder Blutagar bei 37°C recht gut. Aus klinischem Untersuchungsmaterial wachsen Zygomyceten jedoch schlecht an. Wenn ein Zygomycet überhaupt anwächst, zeigt sich meist nach 24 Stunden bereits sichtbares schnelles Wachstum eines hohen weißen

Luftmyzels (Abb. 3). Schon nach wenigen Tagen sind die charakteristischen Endosporangien (Köpfchen) ausgebildet, deren Morphologie zusammen mit der Architektur der Myzelien, Traghyphen und ggf. Würzelchen die Artdiagnose ermöglicht (*Rhizopus oryzae*, Abb. 4).

Molekulare Diagnostik: Spezifische Primer für Zygomyceten auf dem 18S rRNA-Gen wurden beschrieben. Die Sequenzierung von Amplifikationsprodukten ermöglicht die Artdiagnose von Zygomyceten aus Gewebe oder von sterilen Kulturen.

Literatur

1. Cooper, CR. From Bamboo Rats to Humans: The Odyssey of *Penicillium marneffei*. ASM News, 64, 390-397 (1998)
2. Yeo, SF & Wong, B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. Clin. Microbiol. Rev. 15, 465-484 (2002)
3. Rimek, D, Zimmermann, T, Hartmann, M, Prariyachatigul, C, Kappe, R: Disseminated *Penicillium marneffei* infection in an HIV-positive female from Thailand in Germany. Mycoses 42, Suppl.2, 25-28 (1999)
4. Ribes, JA, Vanover-Sams, CL & Baker, DJ. Zygomycetes in human disease. Clin. Microbiol. Rev. 13, 236-301 (2000)

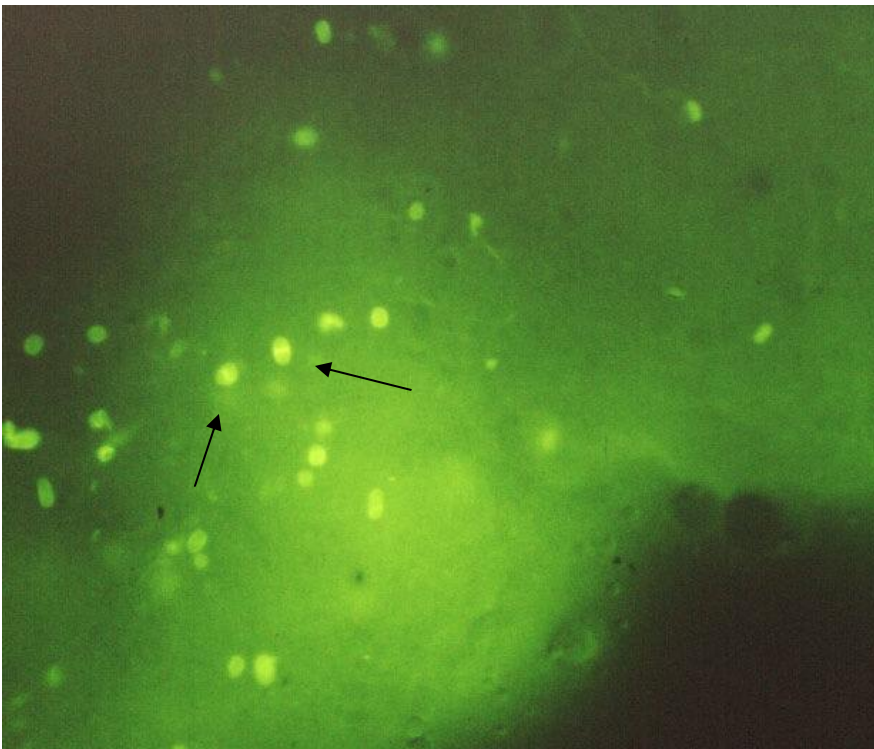


Abb. 1

Halslymphknoten-Quetschpräparat einer 33-jährigen Thailänderin mit AIDS und *Penicillium marneffei*-Infektion. Calcofluorweiß-Färbung. Originalvergrößerung 400-fach. Die meisten ca. 2 µm großen hefeartigen Zellen weisen große Ähnlichkeit mit *Histoplasma capsulatum* auf. Charakteristisch für *P. marneffei*

sind die wenigen extrazellulär liegenden, länglichen, nach Querteilung septierten Zellen (Pfeile).



Abb. 2
Penicillium marneffei-Kultur von oben 28 Tage nach Dreipunkt-Inokulation und Bebrütung bei 28°C auf Sabouraud-Glukose-Agar. Das weiße Luftmyzel bleibt flach. Ältere Bereiche der Kolonien werden rosa. Der ganze Agar ist durch den charakteristischen diffusiblen Farbstoff gerötet.



Abb. 3
Rhizopus oryzae. Kultur nach 15 Stunden (links) und nach 40 Stunden (rechts) bei 37°C auf Sabouraud-Glukose-Agar. Der Thallus-Durchmesser beträgt bereits nach 15 Stunden 5 cm und das weiße Luftmyzel ist 1 cm hoch. Nach 40 Stunden ist die Petrischale zugewachsen und es sind schon junge, noch helle Köpfchen (Sporangien) ausgebildet, die sich innen am Deckel der Petrischale anlagern (Deckel hier abgenommen).

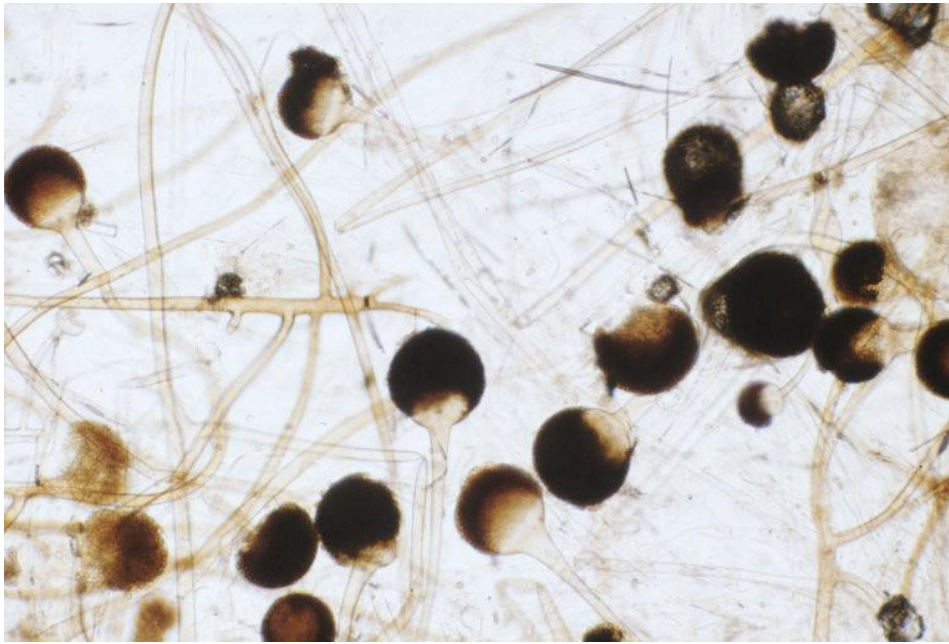


Abb. 4

Rhizopus oryzae. Nativpräparat, ungefärbt, Originalvergrößerung 100-fach. Das Präparat wurde von einer 5 Tage alten Kultur auf Sabouraud-Glukose-Agar angefertigt. Die reifen kugelförmigen Köpfchen (Sporangien) waren mit bloßem Auge sichtbar. Sie haben einen Durchmesser von ca. 200 μm . Die Columella (die runde Auftreibung am Ende der Traghyphen) füllt über die Hälfte des Sporangiums aus. Alle Traghyphen (braune Eigenfarbe) entspringen aus einem Knoten, an dem auch kurze, braune, kaum verzweigte Rhizoide (Wurzeln) inserieren.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Reinhard Kappe, Haema Institut für Labormedizin, Nordhäuser Str. 74, 99089 Erfurt, Tel.: 0361-7812710, Fax: 0361-7812716, e-mail rkappe@haema.de

Wertigkeit des *Aspergillus*-Galactomannan-Antigen-Nachweises zur Diagnostik invasiver Aspergillosen

Dagmar Rimek

Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Dezernat Medizinische Mikrobiologie, Erfurt

Die invasive Aspergillose (IA) stellt für immunsupprimierte Patienten, insbesondere mit hämatologischen Erkrankungen und nach Knochenmarktransplantation, nach wie vor eine ernste Erkrankung mit hoher Letalität dar. Ein schneller und sicherer Nachweis von *Aspergillus* mittels kultureller Methoden oder Antigennachweis hat daher die größte Bedeutung für eine rechtzeitige Diagnosestellung und Therapieeinleitung.

Galactomannan (GM) ist ein wichtiger Bestandteil der Zellwand von *Aspergillus* spp. Der erste kommerziell erhältliche Test zum GM-Nachweis war ein Latex-Agglutinationstest (Pastorex[®], Fa. Sanofi-Pasteur / Fa. Bio-Rad, München) mit einer Nachweisgrenze von 15 ng GM pro ml Serum. Der Test basiert auf dem monoklonalen Rattenantikörper EB-A2, gerichtet gegen Galactomannan von *Aspergillus* spp. Er zeigt eine hohe Spezifität, die Sensitivität ist hingegen zu niedrig, sie liegt je nach Studie zwischen 25 und 70 %. Eine deutliche Verbesserung brachte der 1995 eingeführte Platelia[®] *Aspergillus* ELISA (Fa. Sanofi-Pasteur / Fa. Bio-Rad, München). Hierbei handelt es sich um einen Ein-Phasen-Sandwich ELISA, bei dem der monoklonale Rattenantikörper EB-A2 sowohl als Bindungs-, als auch als Nachweisantikörper eingesetzt wird (1). Die untere Nachweisgrenze des Tests beträgt 1 ng GM pro ml Serum. Die Auswertung erfolgt durch Indexbildung mittels eines cut-off Serums. Bei einem Index < 1 gilt die entsprechende Serumprobe als GM-negativ, ein Index zwischen 1 und 1,5 wird als fraglich bewertet, bei einem Index $\geq 1,5$ ist die Probe GM-positiv. Fragliche und positive Proben sollten durch eine zweite Serumprobe bestätigt werden. Zwei aufeinanderfolgende positive Proben weisen auf das Vorliegen von GM im Serum hin und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen einer IA. Bei Risikopatienten wird ein Screening ein bis zweimal pro Woche empfohlen (2).

Sensitivität und Spezifität des Assays zur Diagnostik der IA bei hämatologischen Patienten wurden in diversen Studien bestimmt. Die Sensitivität lag bei Patienten mit gesicherter IA bei 65 bis 100 %, die Spezifität zwischen 90 und 98 % (3). In einem Teil der Fälle war dabei der GM-ELISA vor dem Auftreten klinischer Symptome positiv, so daß er zu einer frühzeitigen Diagnosestellung beitragen konnte. Neuere Studien empfehlen den cutoff auf 0,5 herabzuset-

zen, da dies zu einer früheren Diagnosestellung beiträgt (4). Unter der Maßgabe von zwei aufeinander folgenden positiven Seren wird die Spezifität dadurch nicht wesentlich verschlechtert.

Die Spezifität des GM-Nachweises ist zwar hoch, falsch positive Ergebnisse können jedoch vorkommen. So wurden Kreuzreaktionen des verwendeten Antikörpers mit anderen Pilzen wie *Penicillium*, *Paecilomyces* und *Alternaria*, mit Nahrungsmitteln wie Getreide, Getreideprodukten und Milchprodukten, mit Antibiotika wie Piperacillin-Tazobactam oder mit Lipoteichonsäure von *Bifidobacterium* spp. beschrieben. Ein einzelner positiver Wert sollte daher immer durch sofortige Untersuchung eines Zweitserums bestätigt werden.

Der derzeitige hohe Stellenwert des Platelia[®] *Aspergillus* ELISA in der Diagnostik der IA wird dadurch deutlich, daß der Test in die Definitions- und Klassifikationskriterien der IA aufgenommen wurde (5). Seit Mai 2003 ist er darüber hinaus in den USA von der FDA zugelassen. In drei amerikanischen Krebszentren wurden 1.890 Serumproben von 170 Patienten untersucht. Der Platelia[®] *Aspergillus* ELISA erreichte eine Sensitivität von 80,7% und eine Spezifität von 89,2%, was die FDA zur Zulassung veranlaßte.

Damit hat der GM-Nachweis mittels Platelia[®] *Aspergillus* ELISA derzeit bei Risikopatienten einen festen Stellenwert in der frühzeitigen Diagnostik einer IA.

Literatur

1. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latgé JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 497-500
2. Denning DW, Evans EG, Kibbler CC, Richardson MD, Roberts MM, Rogers TR, Warnock DW, Warren RE. Guidelines for the investigation of invasive fungal infections in haematological malignancy and solid organ transplantation. *British Society for Medical Mycology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997, 16: 424-36
3. Yeo SF, Wong, B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15: 465-484
4. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004, 190: 641-649
5. Ascoglu S, Rex JH, de Pauw B *et al.* Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: An international consensus. *Clin Infect Dis* 2002, 24: 7-14

Korrespondenzadresse

Dr. Dagmar Rimek, Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz,
Dezernat Medizinische Mikrobiologie, Nordhäuser Str. 74, D-99089 Erfurt, phone: +49-361-
7409125; Fax: +49-361-7409111; e-mail drimek@tllv.thueringen.de

Histopathologische Diagnostik von invasiven Schimmelpilzinfektionen

Lars-Christian Horn

Institut für Pathologie, Universität Leipzig

Einleitung

Bei Risikopatienten lassen sich Schimmelpilze morphologisch in verschiedenen Materialien mit differenten Methoden nachweisen. Abgesehen von der immunhistochemischen Detektion (s. u.) kann rein histomorphologisch die Pilzinfektion zwar bewiesen werden; eine Artbestimmung des jeweiligen Erregers ist jedoch der mykologischen Untersuchung vorbehalten.

In Abhängigkeit vom Studienkollektiv und dem Design jeweiliger Untersuchungen lassen sich bei bis zu 25 % aller Patienten mit einem Tumorleiden bzw. hämatologischer Systemerkrankung invasive Mykosen nachweisen.

Makroskopie

Im Rahmen der autoptischen Diagnostik sind charakteristische makroskopische Befunde nicht zu erwarten. Oberflächliche Infektionsherde auf Schleimhäuten sind nicht selten über Erosionen bzw. Ulzerationen angeordnet und weisen eine granulierte Struktur, teilweise mit Randwallbildung auf. Pulmonale Läsionen und solche in verschiedenen parenchymatösen Organen bei disseminierter (*Aspergillus*-) Infektion weisen meist eine geringe umschriebene Konsistenzvermehrung mit brüchig-bröckeliger Konsistenz auf und sollten histologisch untersucht werden. Bedingt durch die ausgeprägte Gefäßinvasion entstehen häufig Ischämiebezirke, die hämorrhagisch imbibierte bzw. infarziert sein können (insbesondere in Lunge und Hirn).

Makroskopisch sichtbare Aspergillome sind bei disponierten, immunsupprimierten Patienten selten.

Histologie invasiver Schimmelpilzinfektionen

Histomorphologisch findet sich bei der *Mucor*-Infektion ein sehr breites Myzel mit etwa 20-30 µm Durchmesser (bei *Aspergillus* bis etwa 5 µm Durchmesser; Brandt 1980) mit starken Kaliberschwankungen.

Die *Aspergillus*-Mykose zeigt histologisch ein regelmäßig dichotom verzweigtes, meist echtes Myzel mit Septierungen und oft geordnetem Wachstum (Abb. 5 und 6). Bei Abstrichen oder Spülzytologien aus dem Respirationstrakt kann man gelegentlich die charakteristischen und namengebenden Fruchtköpfchen erkennen.

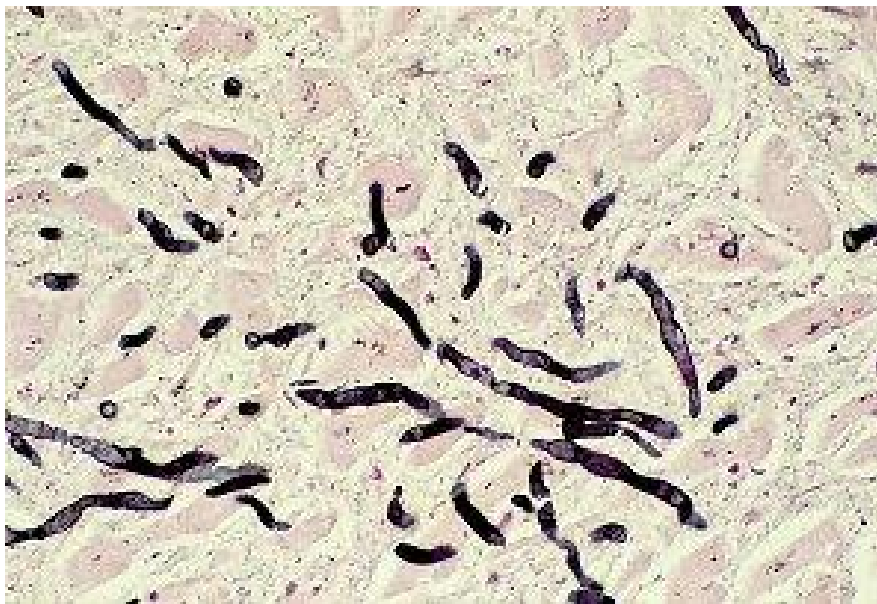


Abb. 5
Septiertes und
dichotom verzweigtes
Myzel von *Aspergillus
flavus* im Herzmuskel,
Grocott- Gomori
(Versilberungstechnik).

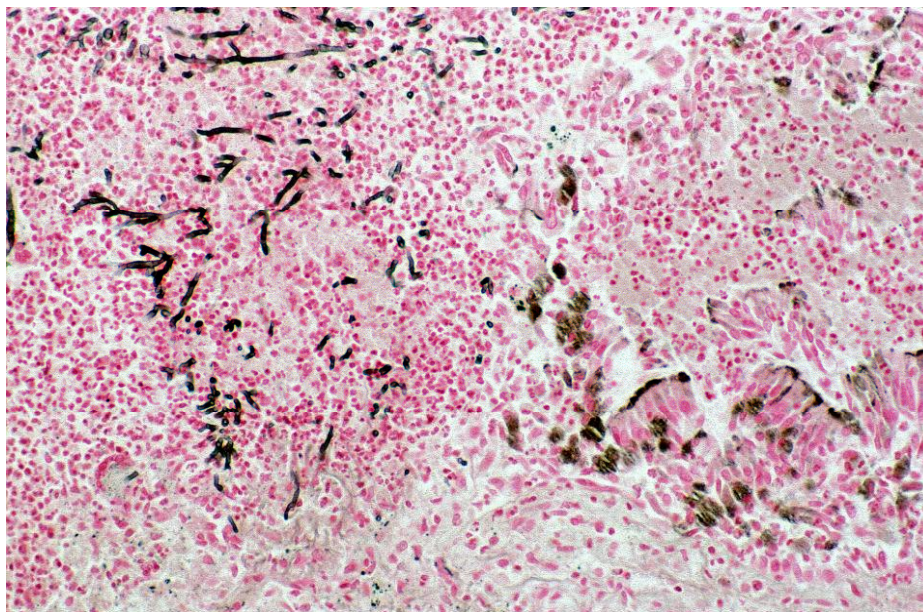


Abb. 6
*Aspergillus
fumigatus*-Infektion
der Lunge. Invasives
Wachstum der
Hyphen im
Lungengewebe.

Histomorphologisch ist eine Unterscheidung zu einer durch *Scedosporium*-Species hervorgerufenen Mykose nicht möglich (Nenoff et al. 1998).

Bei diagnostischen Biopsien ist es wichtig, daß der Verdacht auf eine Pilzinfektion dem Pathologen mitgeteilt wird, damit bereits *a priori* entsprechende Sonderfärbungen (s. u.) angeordnet werden können bzw. eine ausgedehnte Materialentnahme erfolgt und somit kein Zeitverlust bei der Diagnostik eintritt.

Der färberische Nachweis von Schimmelpilzen hängt im wesentlichen vom Erhaltungszustand bzw. dem Alter des Myzels ab.

Die histologische Detektion einer Mykose ist im konventionellen Hämatoxylin-Eosin-färbten Schnitt prinzipiell möglich, kann jedoch beim Vorhandensein nur weniger oder schlecht erhaltenen Pilzstrukturen falsch-negativ sein. Die Verwendung der PAS-Färbung ist oft hilfreich. Aufgrund des Verlustes von sauren Molekülgruppen bei alternden Hyphen und nach antimykotischer Therapie hat sich die Versilberung nach Grocott enorm bewährt. Sie ist jedoch nicht spezifisch für den Pilznachweis. Nachteilig gegenüber der PAS-Färbung ist der relativ hohe Sach- und Zeitaufwand sowie die Tatsache, daß die notwendigen Färbereagenzien immer frisch hergestellt werden müssen.

Prinzipiell ist die fluoreszenzoptische Darstellung mit sog. optischen Aufhellern („Weißmachen“) möglich. Einschränkend muß gesagt werden, daß die Färbereaktion in einem abgedunkelten Raum durchzuführen ist und ein Fluoreszenzmikroskop mit einem entsprechend geeignetem Filtersatz die notwendige Ausrüstung darstellt.

Der Nachweis von *Aspergillus*-Spezies ist auch immunhistochemisch möglich. Obwohl methodisch aufwendiger, lassen sich insbesondere *Aspergillus*-Infektionen mittels PCR-Technologie auch am Biopsie- bzw. *post mortem* entnommenen Gewebe mit hoher Empfindlichkeit und Spezifität nachweisen.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Lars-Christian Horn, Institut für Pathologie der Universität Leipzig, Liebigstraße 20, D-04103 Leipzig, e-mail hornl@server3.medizin.uni-leipzig.de

Mykotoxine

Herbert Hof

Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Universitätsklinikum Mannheim

Toxine spielen eine große Rolle bei der Pathogenese bakterieller Infektionen als Virulenz- und als Pathogenitätsfaktoren. Die Rolle von Mykotoxinen ist damit keineswegs vergleichbar. Sowohl Hefepilze als auch Schimmelpilze produzieren Mykotoxine d. h. sekundäre Metabolite, wovon es ca. 400 verschiedene chemische Substanzgruppen gibt (1).

Nur ganz selten nämlich fungieren Mykotoxine als Virulenzfaktoren, indem sie eben die Vermehrung der Pilze im Wirt steigern. Allenfalls Gliotoxin, das bei *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans* vorkommt, hat diese Funktion. Es inhibiert NFκB und stört damit diverse Funktionen der Wirtszellen bis hin zur Apoptose. Bei der Soorvaginitis wird dieses Pilzprodukt in großer Menge im entzündlichen Sekret angetroffen (2) und kann dort die Funktion der Granulozyten stören (3). Bei massiver Vermehrung von *Candida* im Dickdarm soll angeblich diese zytotoxische Substanz bewirken, daß Zellbarrieren abgebaut werden, so daß der Pilz leichter ins Gewebe vorrücken kann. (4)

Dann wirkt es auch immunsuppressiv durch Hemmung der Funktion von Immunzellen. Auch bei der Infektion des Auges mit *Fusarium* spp. sollen Mykotoxine das Fortschreiten der Pilzinfektion bahnen (5).

Die anderen Mykotoxine sind allenfalls Pathogenitätsfaktoren, d. h. sie schädigen den Wirt, ohne daß der produzierende Pilz selbst davon profitiert.

Die meisten Mykotoxine werden mit der Nahrung aufgenommen. Bei akuter Intoxikation werden verschiedene Organe geschädigt, vor allem Niere und Leber; allerdings ist die chronische Wirkung viel bedeutungsvoller, da viele dieser Mykotoxine akkumulieren und dann nicht nur Organe schädigen sondern auch mutagen, teratogen und nicht zuletzt auch cancerogen wirken können. Im Einzelfalle ist jedoch die Bedeutung der Mykotoxine schwer zu definieren; die tatsächliche Rolle der Mykotoxine als Einzelsubstanz aber auch in Verbindung mit anderen Noxen bei der Entstehung von Krebs ist bislang nur zu vermuten. Die cancerogene Wirkung von Aflatoxin B (vor allem in Kombination mit dem Hepatitis B-Virus) ist weithin bekannt, obwohl dieses Mykotoxin bei uns kaum eine Rolle spielt, weil der Pilz *Aspergillus flavus* in unseren Lebensmitteln nur selten das Toxin produziert und die belasteten Produkte aus den tropischen Ländern beim Import auf Grenzkonzentrationen hin kontrolliert werden.

Patulin, Ochratoxin, Nivalenol und Desoxynivalenol (DON) belasten die Nahrung viel häufiger. Durch Akkumulation über Jahre können sie diverse Organschäden induzieren, aber auch mutagen wirken. Zearalenone sind eigentlich Phytoöstrogene, die in der Umwelt stabil sind und auch im Menschen an den 17 β -Oestrogenrezeptor binden und dieselbe Wirkung auslösen wie die Antikonzeptiva (6).

Stachybotrys chartarum ist ein Schwärzepilz, der hohe Feuchtigkeit zum Wachstum benötigt, er produziert Sporen, die große Mengen von Stachylysin, einem Hämolyisin, Satratoxin, einem Trichotecen, und verschiedene andere Toxine enthalten. Diese Toxine werden also aerogen über die Sporen übertragen. Sie schädigen akut die Schleimhäute der Atemwege. Kleine Moleküle können als volatile organic compounds (VOC) aerogen übertragen werden. Man erkennt sie in belasteten Innenräumen schon an ihrem muffigen, modrigen Geruch; die Anfälligkeit der Menschen ist recht unterschiedlich; manche Individuen entwickeln mehr als nur Befindlichkeitsstörungen (sick building syndrome) (1).

Auch Griseofulvin und Penicillin sind im Prinzip Mykotoxine mit antibiotischer Wirkung, Ciclosporin A ist ein Metabolit mit stark immunsuppressiver Eigenschaft (1).

Literatur

- 1 Hof H. Mykologie für Mediziner. Grundlagen-Pathogenese-Manifestationen-Diagnostik-Therapie. Thieme Verlag, Stuttgart, 2003
- 2 Shah DT, Glover DD, Larsen B. *In situ* mycotoxin production by *Candida albicans* in women with vaginitis. Gynecol. Obstet. Invest. 1995; 39: 67-69
- 3 Shah DT, Jackman S, Engle J, Larsen B. Effect of gliotoxin on human polymorphonuclear neutrophils. Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 1998; 6:168-175.
- 4 Upperman JS, Potoka DA, Zhang XR, Wong K, Zamora R, Ford HR. Mechanism of intestinal-derived fungal sepsis by gliotoxin, a fungal metabolite. J Pediatr Surg. 2003; 38: 966-970
- 5 Naiker S, Odhav B. Mycotic keratitis: profile of *Fusarium* species and their mycotoxins. Mycoses 2004; 47: 50-56
- 6 Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 2003; 16: 497-516

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Herbert Hof, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Mannheim/Heidelberg, Theodor-Kutzer-Ufer, D-68167 Mannheim, e-mail herbert.hof@imh.ma.uni-heidelberg.de

Diagnostik bei Schimmelpilz-Allergien

Jörg Kleine-Tebbe, Dietmar A. Herold, Gert Kunkel, Berlin

Allergie- und Asthma-Zentrum Westend

Schimmelpilzbestandteile (SPB) können IgE-vermittelte Symptome und in seltenen Fällen akute oder chronische Beschwerden einer exogen-allergischen Alveolitis (EAA) induzieren. Während der Atopiker ein erhöhtes Risiko für eine allergische Rhinokonjunktivitis (ARK) und allergisches Asthma bronchiale (AA) durch SPB besitzt, ist die EAA häufig durch lokalisierte oder berufliche Exposition bedingt. Aufgrund uncharakteristischer Beschwerden (siehe Tab. 1) wird die EAA nicht selten zu spät erkannt, so daß sich die pneumologische Abklärung [1] verzögert und irreversible Veränderungen bis zur Lungenfibrose drohen, besonders wenn keine konsequente Allergenkarrenz erreicht wird.

Aufgrund der parallelen Gräserblüte werden sommerliche IgE-vermittelte Beschwerden durch SPB (von Juni bis September durch *Alternaria*; Maximum: Juli - August) häufig fehlinterpretiert. Die saisonalen Schimmelpilze gehören bei Heuschnupfenverdacht in die Routine-Allergiediagnostik (Pricktest), obwohl sie weitaus seltener positiv sind als Gräserextrakte. Eine ergänzende Bestimmung des spezifischen IgE bei positiven Hautreaktionen sichert den Verdacht einer allergischen Sensibilisierung gegen SPB. Die klinische Relevanz ist anamnestisch nicht immer eindeutig, so daß vor therapeutischen Entscheidungen ein konjunktivaler oder nasaler Provokationstest durchzuführen ist. Bleibt eine positive Reaktion aus, ist bei anamnestischen oder klinischen Asthmahinweisen vor Entscheidung zur spezifischen Immuntherapie eine spezifische bronchiale Provokation (nur beim erfahrenen Pneumologen) geeignet, die klinische Relevanz einer Schimmelpilzallergie (meistens gegen *Alternaria* [3], seltener *Cladosporium*) zu sichern. Der positive Provokationstest ist folglich neben einer hinweisenden Anamnese und dem Sensibilisierungsnachweis (Pricktest und spez. IgE) eine notwendige Voraussetzung für die Indikation zur spezifischen Immuntherapie mit SPB. Die allergologische Diagnostik mit anderen Schimmelpilzspezies ist häufig durch unzureichend charakterisierte Extrakte erschwert [4], abgesehen davon, daß sie außer der Karenzempfehlung i. d. R. keine therapeutischen Konsequenzen hat, da nur mit Extrakten von *Alternaria* und *Cladosporium* die spezifische Immuntherapie in klinischen Studien erfolgreich angewandt und dokumentiert wurde. Nachweismethoden von SPB in Innenräumen werden intensiv diskutiert [5] und sind für die Routineanwendung (noch) nicht zu empfehlen.

Tab. 1: Synopsis allergischer Erkrankungen durch Schimmelpilzantigene:

(Abkürzungen: AA Allergisches Asthma, ARK Allergische Rhinokonjunktivitis, BAL bronchoalveoläre Lavage, EAA Exogen allergische Alveolitis, RG Rasselgeräusche, SPB Schimmelpilzbestandteile)

| | ARK, AA | EAA |
|-----------------------|---|---|
| Mechanismus | Typ-I-Reaktion | Typ-III/Typ-IV-Reaktion |
| Risikofaktoren | Atopie | (berufliche) Exposition |
| Antigene | (Glyko)-Proteine (z. B. von <i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i>) | u. a. SPB (z.B. bei Farmer- u. Befeuchterlunge) u. (Glyko)-Proteine von Bakterien (Thermoactinomydeten, Micropolyspora) |
| Exposition | häufig ubiquitär, <i>Alternaria</i> : Juli, August, auch nach Regen | häufig lokal, ggf. beruflich |
| Symptome* | ARK: Augenjucken, -rötung, -schwellung, Niesen, Fließschnupfen, Nasenblockade AA: Schweratmigkeit, trockener Husten, Anstrengungs-bedingte Kurzatmigkeit, Atemnot, Auswurf | akut: Schüttelfrost, Gliederschmerzen, Husten, Fieber chronisch (häufig uncharakteristisch): trockener Husten, Abgeschlagenheit, Belastungsluftnot |
| Hauttest* | Pricktest* | - |
| Labortest* | spezifisches IgE* | Immunkomplexe: zirkulierende IgG-Antikörper und spezifische Antigene |
| Lungenfunktion | ggf. unauffällig, obstruktive Ventilationsstörung, bronchiale Hyperreaktivität, | restriktive Ventilationsstörung, verminderte Lungendehnbarkeit u. Diffusionskapazität |
| Provokation* | nasal* (konjunktival) falls negativ ggf. bronchial* | (inhalativ, ggf. BAL) [2] <i>cave</i> : Exazerbation der EAA |
| Maßnahmen | Allergenkarenz (sofern möglich) spezifische Immuntherapie *diagnostische Voraussetzungen | strikte Allergenkarenz, ggf. BK-Verdachtsmeldung |
| Pharmakother. | wie bei Pollenallergie | systemische Kortikosteroide |
| Prognose | je nach Ausprägung, rechtzeitiger Diagnostik u. Therapie | bei rechtzeitiger Erkennung u. erfolgreicher Allergenkarenz gut |

Literatur

1. Bergmann KC, Costabel U, Knape H, Kroidl R, Müller-Wening D, Repp H, Rust M, Schwarz H, Sennekamp J. Empfehlungen zur Diagnosestellung einer exogen-allergischen Alveolitis. *Allergologie* 1990; 13: 11-112
2. Bergmann KC, Kroidl R, Liebetau G, Müller-Wening D, Sennekamp J, Vogelmeier C. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie: Empfehlungen zur inhalativen Provokationstestung bei exogen-allergischer Alveolitis. *Pneumologie* 1998; 52: 444-6
3. Bush RK, Prochnau JJ. *Alternaria*-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 227-34
4. Esch RE. Manufacturing and standardizing fungal allergen products. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 210-5
5. Portnoy JM, Barnes CS, Kennedy K. Sampling for indoor fungi. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 189-98

Korrespondenzadresse

Priv.-Doz. Dr. Jörg Kleine-Tebbe, Allergie- u. Asthma-Zentrum Westend, Spandauer Damm 130, Haus 9, 14050 Berlin, Tel: 030-30202910, Fax: 030-30202920, e-mail kleine-tebbe@allergie-experten.de

Dermatomykosen durch Schimmelpilze

Pietro Nenoff

Obwohl vergleichsweise selten, sind Schimmelpilze als Krankheitserreger durchaus auch bedeutungsvoll, u. a. für folgende dermatologische bzw. allergologische Krankheitsbilder [Nenoff et al. 2000 und 2004]:

1. Haut- und Schleimhautinfektionen,
2. Nagelinfektionen im Sinne einer Onychomykose
3. Rhinitis allergica und Asthma bronchiale durch Schimmelpilzsporen.

Schimmelpilzinfektionen der Haut

Hautinfektionen durch Schimmel kann man sehen, wenn Verbrennungswunden oder eine diabetische Gangrän mit z. B. *Fusarium* spp. (Abb. 7) oder *Aspergillus* (A.) spp. sekundär besiedelt oder eben infiziert sind.



Abb. 7

Fusarium solani: Charakteristische Makrokonidien in Halbmondform, einfach septiert. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Herrn Herrmann und Hartmut Bindara, SBBS für Gesundheit und Soziales, Jena, zur Verfügung gestellt.

Zunehmend wird außerdem über kutane Aspergillosen berichtet. Diese treten primär auf, neuerdings mehr bei AIDS-Patienten, aber auch bei septischer, chronischer Granulomatose. Daneben sind auch sekundär, durch hämatogene Streuung entstandene Aspergillosen möglich. Erreger ist nicht immer *A. fumigatus*, gelegentlich auch *A. flavus*. Letztere Spezies ist vor allem deshalb problematisch, weil das Ansprechen *in vitro*, möglicherweise auch *in vivo* gegenüber einer intravenösen Amphotericin B-Therapie aufgrund einer verminderten Antimykotikumempfindlichkeit wesentlich schlechter ist.

Kasuistik: sekundäre Aspergillose der Haut

Ein 64-jähriger Patient erkrankte an einem hypoplastischen myelodysplastischen Syndrom (MDS), welches durch Panzytopenie und zytogenetische Aberrationen gekennzeichnet war. Nachdem sich eine sekundäre akute myeloische Leukämie entwickelt hatte, wurde eine Induktionstherapie (OSHO-Schema = Chemotherapie entsprechend der sog. Ostdeutschen Studiengruppe bei Patienten über 60 Jahren) durchgeführt, die zur partiellen Remission führte. Daraufhin Durchführung der zweiten Induktionstherapie – ebenfalls nach dem OSHO-Protokoll – sowie einer allogenen, verwandten (von der Schwester) Blutstammzelltransplantation. An der Haut entwickelten sich Zeichen einer Graft versus host-Krankheit.

Es traten thorakale Schmerzen und Dyspnoe (bei Linksherzinsuffizienz) auf, der Verdacht auf eine Pneumonie wurde geäußert. In der Thorax-Computertomographie waren diffuse bilaterale Infiltrate als Aspergillose-verdächtige Herde im linken Oberlappen zu erkennen. Der Patient wurde beatmungspflichtig.

Nach Bronchoskopie war in der BAL (bronchoalveoläre Lavage)-Flüssigkeit serologisch *Aspergillus*-Antigen (Pastorex[®]) nachweisbar, außerdem wuchs auf Sabouraud-4 % Glukose-Agar *A. flavus* (Abb. 8 c).

Der Zustand des Patienten verschlechterte sich, es kam zum Multiorganversagen. Die kardiale Insuffizienz wurde hochdosiert mit Katecholaminen, die Niereninsuffizienz durch Hämofiltration behandelt. Dazu kam eine ausgeprägte Neutropenie. Zunächst wurde konventionelles Amphotericin B (50 mg/d), danach AmBisome[®] (liposomal verkapseltes Amphotericin B, 100 bis 150 mg/d) als antimykotische Therapie gegeben.

An Flanke und Rücken traten jetzt 4 bis 5 livid-rote Infiltrationen, teils nodulär, teils hämorrhagisch infarziert imponierend auf (Abb. 8 a). Nach Probeexzision wurden histologisch in der PAS sowie Grocott-Gomori-Färbung in Korium und Subkutis Konglomerate septierter Hyphen gefunden (Abb. 8 e). Aus dem Hautgewebe wuchs extrem schnell (über Nacht) bei 37°C ebenfalls ein Schimmel mit gelb-grünem Luftmyzel, ovalen und runden Vesikeln mit

doppelreihigen Phialiden sowie rauhen Konidiophoren und Konidien: *A. flavus* (Abb. 8 b, d und f).

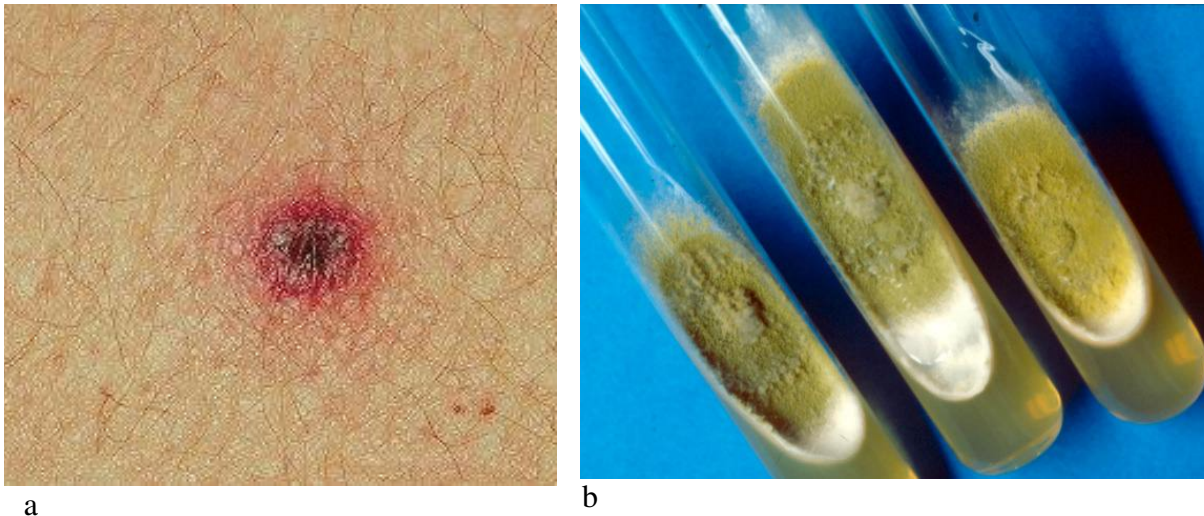


Abb. 8 a-b

A. flavus: (a) immunsupprimierter Patient mit sekundärer kutaner Aspergillose: hämorrhagische, livid-rote, noduläre Läsion der Haut, (b) Wachstum des Isolates aus dem Probebiopsiat der Haut auf Sabouraud 4 %-Glukose-Agar (Probeexzision der Haut)

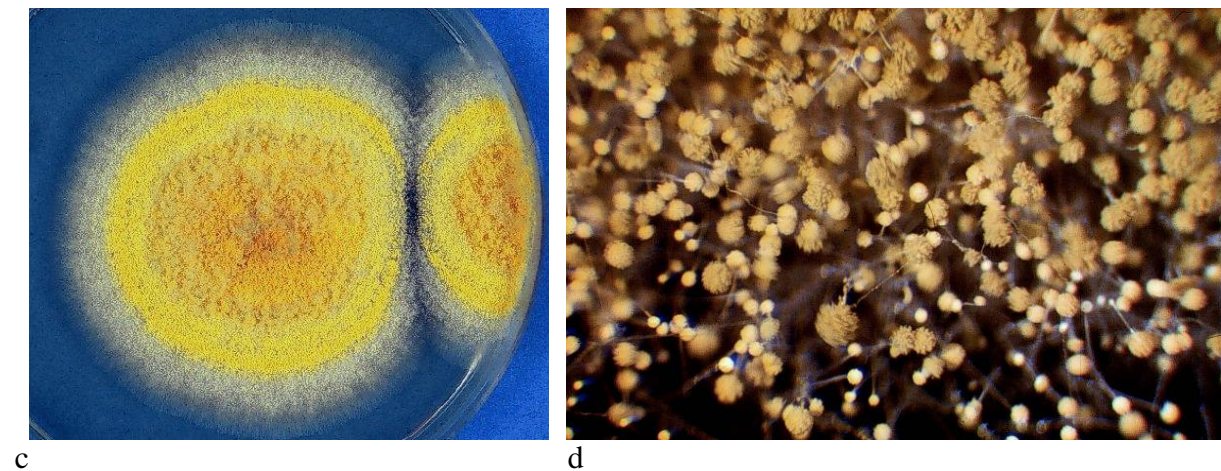


Abb. 8 c-d

A. flavus: (c) auf Sabouraud 4 %-Glukose-Agar, Kulturoberseite mit leuchtend gelber Färbung der Kolonien. Isolat aus bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit bei invasiver Aspergillose mit sekundärer hämatogener Streuung in die Haut, (d) runde Konidienköpfchen bzw. Vesikel eines Isolates (Mikrokultur, Übersichtsvergrößerung)

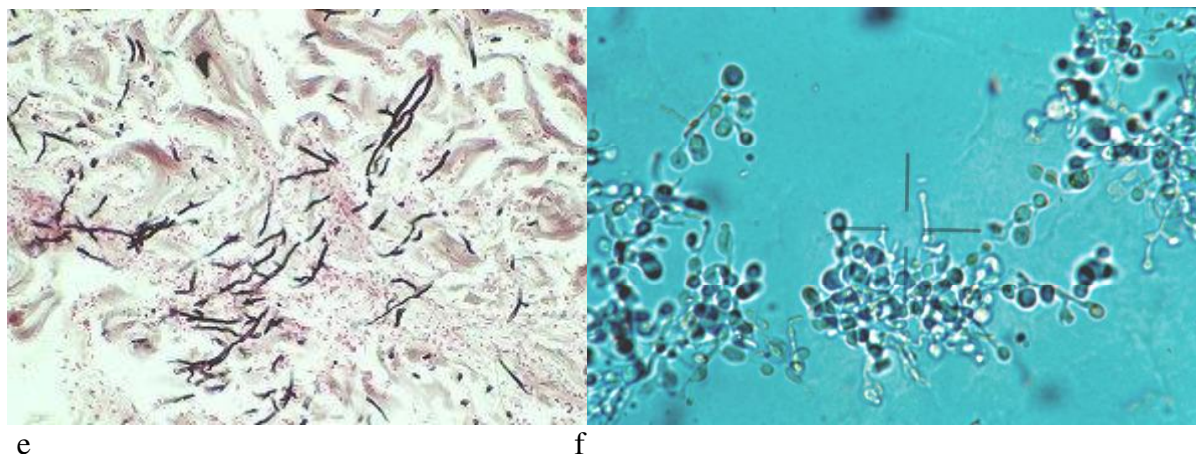


Abb. 8

A. flavus: (e) Septierte Hyphen im Korium bei sekundärer kutaner Aspergillose (Grocott-Gomori-Färbung), (f) rauhwandige, unterschiedlich große Konidien (Lactophenol-Baumwollblau-Färbung)

Die *In vitro*-Empfindlichkeitstestung des Isolates mittels Mikrodilution erbrachte folgende Werte der minimalen Hemmkonzentrationen [$\mu\text{g ml}^{-1}$]: Amphotericin B 2, Ancotil[®] (5-Flucytosin) mäßig empfindlich, Sempera[®] (Itraconazol) 0,5 und Diflucan[®] (Fluconazol) 64. Der hohe Wert der MHK für Fluconazol ist nicht verwunderlich, da dieses Triazolantimykotikum selbstverständlich nicht gegen Schimmel wirkt. Bemerkenswert ist jedoch der MHK-Wert von 2 $\mu\text{g/ml}$ für Amphotericin B, da bereits Hemmkonzentrationen $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ als resistent gelten.

Trotz hochdosierter antimykotischer Therapie starb der Patient an der *Aspergillus*-Pneumonie und generalisierter Aspergillose mit Dissemination ins Herz und in die Haut [Nenoff et al. 2002].

Kutane Aspergillosen: Häufigkeit

In der Literatur finden sich Angaben zu ca. 50 Patienten mit soliden Malignomen, bei denen eine primäre bzw. sekundäre Aspergillose der Haut aufgetreten war. Bei 10 % der non-HIV-Patienten mit disseminierter Aspergillose bzw. 4 % der hämatologischen Patienten mit invasiver pulmonaler Aspergillose und sekundärer hämatogener Streuung kommt es laut aktueller Untersuchungen aus dem Jahr 2000 zu einer Aspergillose der Haut [D'Antonio et al. 2000].

Primäre kutane Aspergillosen

Diese Hautinfektionen entstehen als traumatische Inokulation oder wie bereits erwähnt nach Verbrennungen. Scheinbar disponieren Klebeverbände (u. a. Tegaderm), die man zur Fixie-

rung von Venenkathetern oder Flexülen verwendet zu kutanen Aspergillosen. Eintrittspforte in die Haut sind die beim wiederholten Abreißen der Klebeverbände auftretenden Mikrotraumen.

Es mehren sich in letzter Zeit Berichte über HIV-assoziierte primär kutane Aspergillosen [Murakawa et al. 2000, Roilides et al. 2000]. Risikofaktor ist eine verminderte CD4+-Zellzahl von $<50/\mu\text{l}$. Eine Neutropenie, wie bei Aspergillose sonst typisch, besteht meist nicht, allenfalls eine Ganciclovir-induzierte Neutropenie. Oft ist darüber hinaus eine CMV-Infektion assoziiert.

Sekundäre kutane Aspergillosen

Prinzipiell unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Mechanismen dieser sekundär entstandenen Hautaspergillose. Einmal kann es zur kontinuierlichen Ausbreitung kommen, meist von der Lunge ausgehend in die thorakale Haut. Zum anderen gibt es – und das ist der wesentliche Infektionsweg - die hämatologische Aussaat, in der Regel auch von einer pulmonalen Aspergillose ausgehend und als septische Infarzierungen der Haut imponieren [Burik et al. 1998].

Therapie kutaner Aspergillosen

Primär kutane Aspergillosen werden am häufigsten und mit Erfolg mit Itraconazol und neuerdings mit Voriconazol behandelt. Dem gegenüber umfaßt das Management der sekundär kutanen Aspergillose die intravenöse antimykotische Therapie mit Amphotericin B, Voriconazol oder Caspofungin. Ein konsequentes chirurgisches Debridement erhöht die ohnehin schlechten Heilungschancen [Burik et al. 1998].

Schimmelpilze als Ursache von Onychomykosen

Epidemiologie

Onychomykosen werden nicht nur durch Dermatophyten oder gelegentlich durch Hefen bzw. Sproßpilze hervorgerufen. Bei 1-4 % der Patienten liegt den Nagelveränderungen ein Schimmelpilz zugrunde. Eine sehr sorgfältige, 4000 Patienten mit Onychomykose, Tinea pedis et manuum umfassende epidemiologische Untersuchung von Summerbell et al. [1989] aus Kanada erbrachte, daß Nicht-Dermatophyten 2,3 % der Erreger aller Infektionen und 3,3 % der Erreger von Onychomykosen ausmachten. Die Zahlen aus Deutschland besagen, daß Schimmel nur zu 1,1 % zum Spektrum der verursachenden Pilze bei Onychomykosen beitragen, wie es Abeck et al. [1996] am Beispiel der Universitätshautklinik Hamburg-Eppendorf in den Jah-

ren 1990 bis 1994 zeigten. Ähnliche Zahlen fanden Mayser et al. [1993] für Gießen mit 2,4 % Schimmel als Onychomykoseerreger. Die aktuellste Untersuchung basiert auf der sog. Foot-Check-Studie, die prospektiv 1997 bis 1998 in Deutschland durchgeführt wurde. Eine erste Veröffentlichung aus dem Jahr 2000 wies bei der Erregerverteilung der Onychomykosen nach, daß 6,2 % Schimmelpilze isoliert wurden [Abeck et al. 2000].



Abb. 9

a) Onychomykose des Großzehennagels durch *Scopulariopsis brevicaulis*

b) Primärkultur von *Scopulariopsis brevicaulis* auf Sabouraud 4 %-Glukose-Agar



Abb. 9 c

Scopulariopsis brevicaulis: große, rauhe Konidien in Kettenform, Lactophenol-Baumwollblau-Präparat

Diagnostik

Beweisend für einen Schimmelpilz als Ursache der Onychomykose ist ein positives Kalilaugenpräparat zusammen mit der mindestens zweimaligen kulturellen Isolierung derselben Schimmelpilzspezies; vorausgesetzt es wird kein Dermatophyt nachgewiesen. Manche Untersucher fordern sogar, daß der Schimmel drei Mal angezüchtet werden sollte, um eine Kontamination bzw. saprophytäres Wachstum auszuschließen.

Erregerspektrum

Die in Frage kommenden Erreger sind wiederum *Aspergillus*-Arten, daneben vor allem der *Penicillium*-ähnliche Schimmel *Scopulariopsis brevicaulis* [Seeliger & Hymer 1981, Tietz & Ulbricht 1999, Abb. 9 a-c], aber auch *Cephalosporium acremonium*, *Chrysosporium pannorum* und *Microascus desmosporus* [Schönborn & Schmoranzner 1970, St. Germain & Summerbell 1996]. Unter den *Aspergillus*-Arten wurden als Erreger von Nagelpilzinfektionen u. a. *A. candidus*, *A. restrictus*, *A. sydowi*, *A. terreus*, *A. unguis* und *A. versicolor* (Abb. 10 a und b) beschrieben.



Abb. 10 a

A. versicolor: grüne Kolonien auf Sabouraud 4 %-Glukose-Agar, rötliches Pigment diffundiert in den Agar

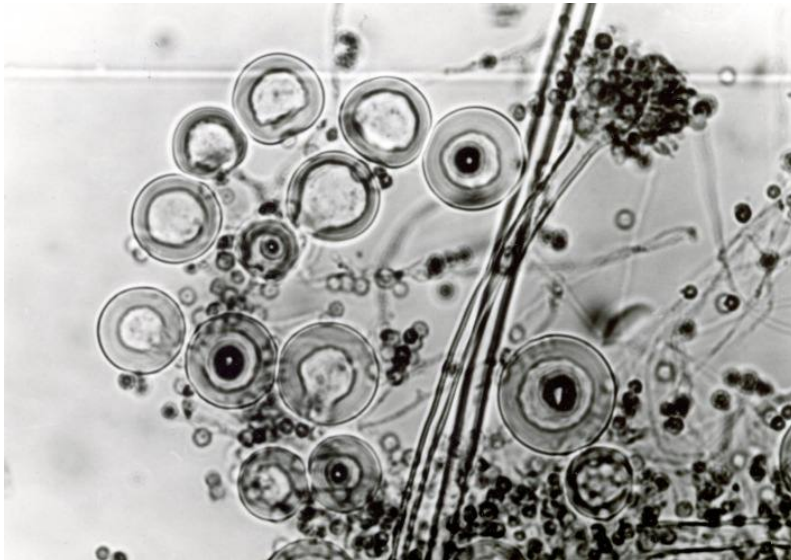


Abb. 10 b

A. versicolor:

Eidam'sche Blasen

= Hüllzellen

Erst unlängst veröffentlichten Torres-Rodríguez et al. [1998] eine Studie zur steigenden Prävalenz von *A. versicolor* als Erreger der Onychomykose. Mit 5,8 % aller Erreger war die Isolierungshäufigkeit dieser *Aspergillus*-Art in dieser Untersuchung aus Spanien erstaunlich hoch. Möglicherweise ist die Häufigkeit von Schimmeln als Onychomykoseerreger auch abhängig von der geographischen Region. So fanden die aus Indien stammenden Autoren Ramani et al. [1993], daß unter 100 Patienten bei erstaunlichen 22 % Schimmel als Ursache der Onychomykose nachgewiesen wurden. Das waren *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus* sowie *Fusarium oxysporum*, *Curvularia* species und *Penicillium* species.

Erst neuerdings wieder muß man zunehmend mit *Hendersonula toruloidea* und *Scytalidium hyalinum* bzw. *Scytalidium dimidiatum* als potentielle Pathogene bei Onychomykosen rechnen [Meisel & Quadripur 1992]. An die zuletzt genannten Erreger muß man denken, wenn die Nägel braun-schwarz verfärbt sind [Campbell et al. 1973].

Ein weiteres „emerging pathogen“ bei Onychomykosen ist der sehr langsam wachsende Schimmelpilz *Onychocola canadensis*, der bei mindestens zehn Patienten, jedoch vorzugsweise aus dem nordamerikanischen Raum, speziell aus Kanada gefunden wurde [Sigler et al. 1994].

Therapie

Erfahrungsgemäß ist eine reine Lokaltherapie bei durch Schimmelpilze verursachten Onychomykosen nicht ausreichend. So sollte beim Nachweis von Schimmeln aus Nagelmaterial an erster Stelle Itraconazol (Sempera[®]) in Form der Pulstherapie eingesetzt werden. Darüber hinaus gibt es jedoch Hinweise, basierend auf *In vitro*-Empfindlichkeitstestungen von

Schimmelpilzen, zum erfolgreichen Einsatz auch von Terbinafin (Lamisil®). Dieses systemische Antimykotikum ist zwar nur für Dermatophyteninfektionen – allenfalls in Kombination mit *Candida parapsilosis* – zugelassen. Wegen der sehr guten *In vitro*-Aktivität speziell gegen *A. versicolor* wird jedoch neuerdings auch Terbinafin zum therapeutischen Einsatz bei entsprechenden Onychomykosen empfohlen [Torres-Rodríguez et al. 1998].

Infektionen des äußeren Gehörganges durch Schimmel

Bekannt ist, daß eine Otitis externa mit einer starken Besiedlung durch *Aspergillus niger* vergesellschaftet sein kann.

Obwohl es sich eher nicht um eine klassische Infektion durch einen Schimmelpilz handelt, sondern wahrscheinlich nur um saprophytäres Wachstum auf ekzematös veränderter Haut bzw. dem Zerumen als Nährsubstrat, ist eine antimykotische Lokalthherapie oft sehr hilfreich. Am Rande erwähnt seien Schimmelpilz-Sinusitiden, u. a. durch *Aspergillus*-Arten (Abb. 11 a und b), selten auch durch Vertreter der *Mucorales*, d. h. Zygomyceten, wie *Mucor*, *Absidia*, *Rhizomucor* oder *Rhizopus*.

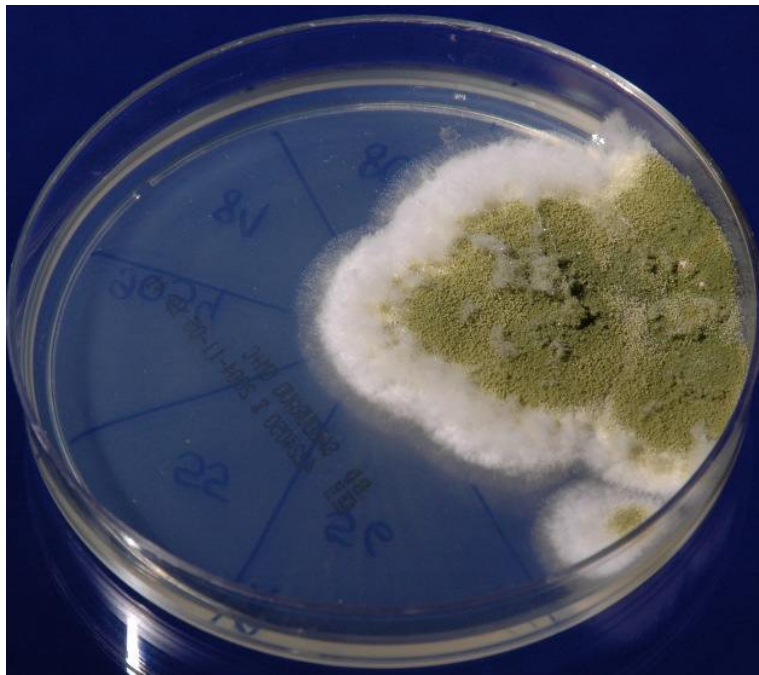


Abb. 11

a) *Aspergillus flavus*

Primärisolat vom
Gehörgangabstrich bei Otitis
externa



Abb. 11

b) *Aspergillus flavus*

Primärisolat vom Gehörgangsabstrich bei Otitis externa, Nahaufnahme

Beim Vorliegen von Risikofaktoren, z. B. Diabetes mellitus, Nierenerkrankungen oder bei Patienten nach Knochenmarktransplantation [Nenoff et al. 1998] kommt es zur fodyoyanten Infektion im Sinne einer rhino-orbito-zerebralen *Mucor*- oder Zygomycose, die fast immer fatal endet.

Eumyzetome

Eumyzetome („Madurafuß“) werden nahezu immer durch Schimmel verursacht; dazu zählen u. a. *Madurella mycetomi*, *Madurella grisea*, *Scedosporium apiospermum* (Abb. 12 a und b), *Neotestudina rosatii*, *Leptosphaeria senegalensis* und auch *Aspergillus* spp. [De Hoog et al. 2000].

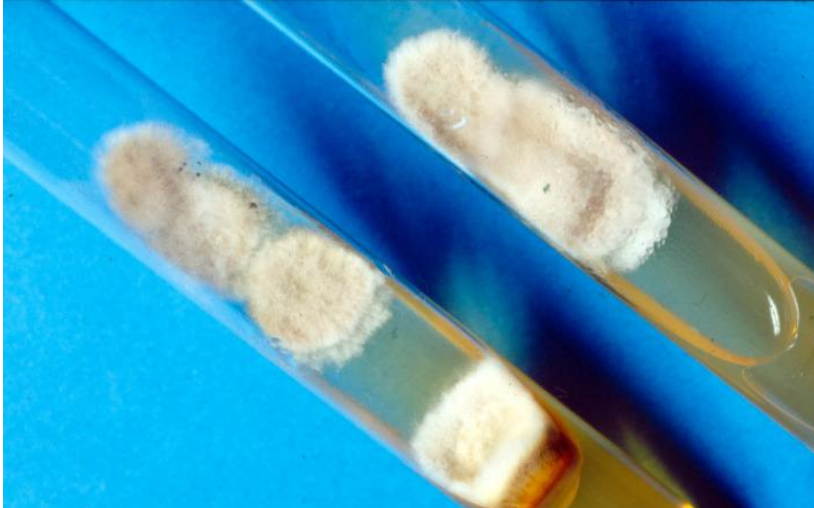


Abb. 12 a
Scedosporium
apiospermum
(*Pseudallescheria boydii*)
Primärisolat mit typischer
grau-weißer Färbung der
Kolonien, Sabouraud 4 %-
Glukose-Agar



Abb. 12 b
Scedosporium apiospermum (*Pseudallescheria boydii*)
Subkultur auf Sabouraud 4 % Glukose-Agar



Abb. 13 a

Eumyzetom am Fußrücken durch *Trichophyton tonsurans* bei einem 17jährigen jungen Mann aus dem Senegal.

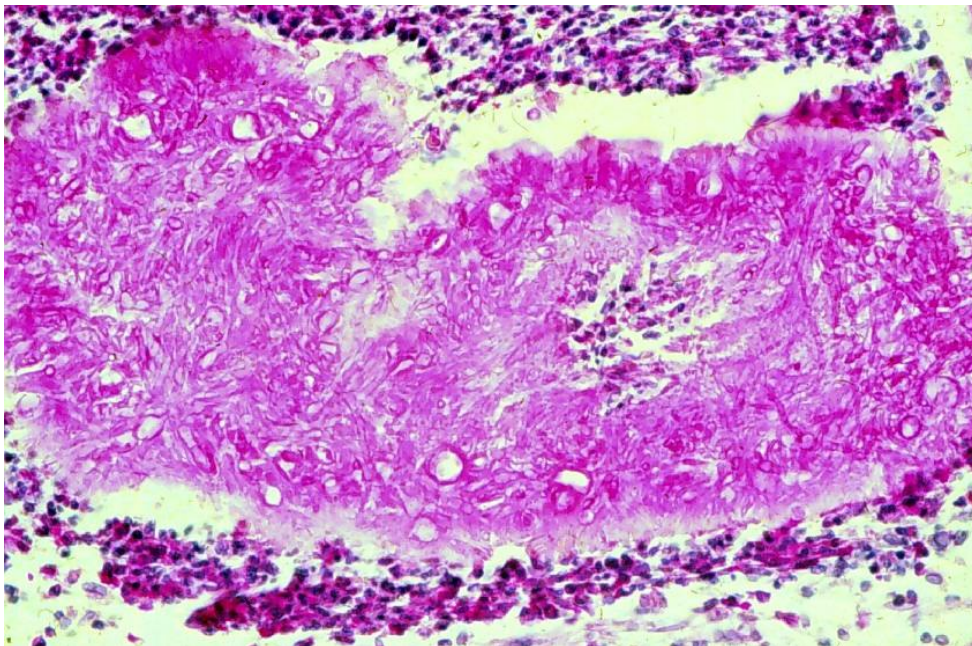


Abb. 13 b

Druse im subkutanen Fettgewebe bei einem Myzetom durch *Trichophyton tonsurans*. PAS-Färbung.

Sehr selten fand sich auch überraschend ein Dermatophyt, u. a. *Trichophyton tonsurans*, als Erreger eines Eumyzetoms [Manz et al. 2001, Abb. 13 a und b]. Für die Therapie wird zunehmend Itraconazol eingesetzt, trotzdem ist im Einzelfall ein chirurgisches Vorgehen, sprich die Amputation der betroffenen Gliedmaße, nicht zu umgehen.

Literatur

1. Abeck D, Gruseck E, Korting HC, Ring J (1996) Onychomykose: Epidemiologie, Pathogenese, Klinik, Mikrobiologie und Therapie. Dt Ärztebl 93: A-2027-2032 [Heft 31-32]
2. Abeck D, Haneke E, Nolting S, Reinel D, Seebacher C (2000) Onychomykose. Aktuelle Daten zu Epidemiologie, Erregerspektrum, Risikofaktoren sowie Beeinflussung der Lebensqualität. Dt Ärztebl 97: A 1984-1986 [Heft 28-29]
3. Burik J-A H van, Colven R, Spach DH (1998) Cutaneous aspergillosis. J Clin Microbiol 36, 3115-3121
4. Campbell CK, Johnson EM, Philpot CM, Warnock DW (1996) Identification of pathogenic fungi. Public Health Laboratory Service London
5. Campbell CK, Kurwa A, Abdel-Aziz A-HM, Hodgson C (1973) Fungal infection of skin and nails by *Hendersonula toruloidea*. Br J Dermatol 89, 45-52
6. Chiller TM, Stevens DA (2000) Treatment strategies for *Aspergillus* infections. Drug Res Updates 3, 89-97
7. D'Antonio D, Pagano L, Girmenia C, Parruti G, Mele L, Candoni A, Ricci P, Martino P (2000) Cutaneous aspergillosis in patients with haematological malignancies. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19, 362-365
8. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd edition 2000, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands & Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain
9. Galimberti R, Kowalczyk A, Hidalgo Parra I, Gonzales Ramos M, Flores V (1998) Cutaneous aspergillosis: a report of six cases. Br J Dermatol 139, 522-526
10. Manz B, Nenoff P, Mittag M, Rytter M, Haustein UF. Eumyzetom (Madurafuß) durch *Trichophyton tonsurans*. Hautarzt 52, 2001, 672-676
11. Mayser P, Gründer K (1993) Das Erregerspektrum der Onychomykosen in der Universitäts-Hautklinik Giessen 1987-1992 und dessen potentielle Bedeutung für eine antimykotische Therapie. Z Hautkr 68, 716-721

12. Meisel CW, Quadripur S-A (1992) Onychomykose durch *Hendersonula toruloidea*. Poster-Abstract, Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Graz, Österreich
13. Murakawa GJ, Harvell JD, Lubitz P, Schnoll S, Lee S, Berger T (2000) Cutaneous aspergillosis and acquired immunodeficiency syndrome. Arch Dermatol 136, 365-369
14. Nenoff P, Gütz U, Tintelnot K, Bosse-Henck A, Mierzwa M, Hofmann J, Horn L-C, Hausteil U-F (1996) Lethal disseminated invasive mycosis caused by *Scedosporium prolificans* in an AIDS patient with Burkitt lymphoma. mycoses 39, 461-465
15. Nenoff P, Hausteil UF. Schimmelpilze als Krankheitserreger. Haut 11, Heft 7, 2000, 258-265
16. Nenoff P, Kellermann S, Schober R, Nenning H, Winkler J, Hausteil U-F (1998) Rhinocerebral zygomycosis following bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukaemia. Report of a case and review of the literature. mycoses 41 (9/10), 1998, 365-372
17. Nenoff P, Mügge C, Hausteil UF. Schimmelpilze: Saprophyten & Pathogene. Allgemeine Aspekte der Diagnostik sowie Differenzierung von *Penicillium* spp. und wichtiger *Aspergillus*-Arten. Haut 15, 2004, 165-168
18. Nenoff P, Kliem C, Mittag M, Horn LC, Niederwieser D, Hausteil UF. Secondary cutaneous aspergillosis due to *Aspergillus flavus* in an acute myeloid leukaemia patient following stem cell transplantation. Eur J Dermatol 12, 2002, 93-98
19. Ramani R, Srinivas CR, Ramani A, Kumari TGR, Shivananda PG (1993) Molds in onychomycosis. Int J Dermatol 32, 877-878
20. Roilides E (2000) Human immunodeficiency virus infection and cutaneous aspergillosis. Arch Dermatol 136, 412-414
21. Sánchez-Sousa A, Alvarez ME, Maiz L, Escobar H, Baquero F (1999) *Aspergillus fumigatus* susceptibility testing by colorimetric microdilution. J Mycol Med 9, 103-106
22. Schönborn C, Schmoranzler H (1970) Untersuchungen über Schimmelpilzinfektionen der Zehennägel. Mykosen 13, 253-272
23. Schiraldi GF, Colombo MD, Harari S, Lo Cicero S, Ziglio G, Ferrarese M, Rossato D, Seebacher C, Blaschke-Hellmessen R (1990) Mykosen. 1. Auflage, Jena, Gustav Fischer-Verlag
24. Seeliger HRP, Heymer T (1981) Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt. Lehrbuch und Atlas. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York

25. Sigler L, Abbott SP, Woodgyer AJ (1994) New records of nail and skin infection due to *Onychocola canadensis* and description of its teleomorph *Arachnomyces nodosetosus* sp. nov. J Med Vet Mycol 32, 275-285
26. St. Germain BS & Summerbell R (1996) Identifying filamentous fungi. A clinical handbook. Star Publishing Company, Belmont, California, USA
27. Summerbell RC, Kane J, Krajden S (1989) Onychomycosis, tinea pedis and tinea manuum caused by non-dermatophytic filamentous fungi. mycoses 32, 609-619
28. Tietz HJ, Ulbricht H (1999) Humanpathogene Pilze der Haut und Schleimhaut. Entnahme, Anzucht und Differenzierung. 1. Auflage, Hannover, Schlütersche Verlag und Druckerei GmbH
29. Torres-Rodríguez JM, Madrenys-Brunet N, Siddat M, López-Jodra O, Jimenez T (1998) *Aspergillus versicolor* as cause of onychomycosis: report of 12 cases and susceptibility testing of antifungal drugs. J Eur Acad Dermatol Venereol 11, 25-31

Korrespondenzadresse

Priv.-Doz. Dr. med. Pietro Nenoff, Laboratorium für medizinische Mikrobiologie, Partnerschaft Dr. rer. nat. Jürgen Herrmann und Priv.-Doz. Dr. med. Pietro Nenoff, Straße des Friedens 8, D-04579 Mölbis, Tel.: 034347-50 323; Fax: 034347-50 123, e-mail info@mykologie-experten.de

Einführung in die Identifizierung von *Aspergillus* und *Penicillium*-Arten

G. Fischer

Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Juniorprofessur „Umwelthygiene – Mykologie und biogene Umwelttoxine“, Universitätsklinikum, RWTH Aachen

Die Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* gehören zu den artenreichsten Gattungen der imperfekten Pilze, mit mehr als 180 beschriebenen *Aspergillus*- und ca. 250 verschiedenen *Penicillium*-Arten. Die Sammlung des CBS (Utrecht) führt ca. 350 verschiedene Artnamen auf. Hierbei muß man berücksichtigen, daß eine aktuelle und übergreifende Monographie dieser Gattung fehlt und daher die Anzahl der bisher beschriebenen validen Arten schwer zu erfassen ist. Diese Vielfalt, aber auch die Ausprägung feiner Unterschiede in der mikromorphologischen Merkmalsausprägung, machen die Identifizierung besonders schwierig.

Die Gattung *Aspergillus* wurde von P.A. Micheli, einem Priester aus Florenz, im Jahre 1729 erstmals beschrieben. Den Namen wählte er in Anlehnung an das „aspergillum“ mit dem in der Katholischen Kirche Weihwasser gespendet wird. Der Name *Penicillium* leitet sich vom lateinischen „penicillus“ (lat. Pinsel) ab, was die sporenbildenden Strukturen in dieser Gattung sehr gut beschreibt. Einige Vertreter der Gattung *Aspergillus* haben Hauptfruchtformen (Teleomorphe) in den Gattungen *Eurotium*, *Emericella* (z. B. *Emericella nidulans*) und *Neosartorya*. Die Aspergillen können morphologisch in zwei Gruppen unterteilt werden, die uniseriaten und die biserialen Arten. Bei den uniseriaten Arten stehen die Phialiden (konidogene, also Konidien-bildende Zellen) direkt auf dem Vesikel (z. B. *A. fumigatus*). Bei den biserialen Arten (z. B. *A. ustus*, *A. versicolor*) stehen die Phialiden in Gruppen auf sog. Metulae, die ihrerseits auf dem Vesikel stehen. Diese morphologische Unterscheidung findet sich nicht in der nomenklatorischen Einordnung wieder, wie dies bei den Penicillien der Fall ist.

Die Arten der Gattung *Penicillium* teilt man nach der Verzweigung der Konidienträger in vier Sektionen (Untergattungen) ein: *Aspergilloides* (monoverticillat, z.B. *P. glabrum*), *Furcatum* (biverticillat, furcat¹, z.B. *P. citrinum*), *Biverticillium* (biverticillat, z.B. *P. variable*) und *Penicillium* (terverticillat, z.B. *P. chrysogenum*, *P. crustosum*). Einige Vertreter der Gattung haben Hauptfruchtformen in den Gattungen *Talaromyces* und *Eupenicillium*.

Die wichtigste Voraussetzung für die verlässliche Identifizierung von Schimmelpilzen ist eine sehr gute mykologische Laborpraxis; dies gilt umso mehr für die Bearbeitung von artenreichen Gattungen wie *Aspergillus* und *Penicillium*. Hierbei ist nicht nur die Verwendung von standardisierten (und für die mykologische Arbeit international anerkannten) Nährmedien, sondern auch die Technik der Isolation, Inokulation, Inkubation, und die Verwendung von Identifizierungsliteratur sowie die Technik der Präparation von Pilzmaterial sehr wichtig (Fischer *et al.* 2002). Die zu verwendenden Medien und Inkubationsbedingungen werden in der jeweiligen Bestimmungsliteratur angegeben.

Kritische Isolate sollten mit mehreren Schlüsseln bestimmt und dem Taxon zugeordnet werden, für das die meisten Merkmale zutreffen. Isolate dürfen niemals mit einem Namen versehen werden, nur um eine „makellose“ Pilzliste zu generieren; dies ist wissenschaftlich unkorrekt. In unklaren Fällen sollte dem Artnamen dann das Kürzel "cf." (lat. *confertur*) hinzugefügt werden (auch in Publikationen). Diese Vorgehensweise zeugt mehr von fachkundiger Arbeit als eine Liste von Namen, die sich später möglicherweise als unkorrekt herausstellen.

¹ furcat: die Metulae sind bei den Vertretern der Sektion *Furcatum* gabelig (engl. *furcate*) am Stiel (engl. *stipe*) des Konidienträgers angeordnet, wohingegen die Metulae bei den Vertretern der Sektion *Biverticillium* parallel zueinander angeordnet sind (engl. *appressed*).

Die folgenden Schlüssel werden empfohlen: Raper und Fennell (1965) umfaßt ein breites Spektrum von Aspergillen, der aktuellste und beste Schlüssel ist Klich (2002), da hier auch Farbfotos der Kulturen abgebildet sind.

Pitt (1979, 1988) ist der umfangreichste Schlüssel für Penicillien, wenn auch die Systematik der terverticillaten Arten seitdem mehrmals überarbeitet wurde. Auch Pitt und Hocking (1985) kann für die meisten häufigen Arten von Aspergillen und Penicillien eingesetzt werden. Für die terverticillaten Arten (58) ist gerade eine neue Monographie von Samson und Frisvad erschienen (CBS, Utrecht). Das Buch „*Introduction to Food- and Airborne fungi*“ von Samson *et al.* (1995, 2000, 2004) ist für die Bestimmung der häufigsten Arten ausreichend (43 *Penicillium*-, 15 *Aspergillus*-Arten), deckt jedoch nur einen kleinen Teil der mono- und biverticillaten Penicillien ab. Das „*Compendium of soil fungi*“ von Domsch *et al.* (1980) ist zwar in Bezug auf die *P. aurantiogriseum* Gruppe taxonomisch nicht auf dem neuesten Stand, umfaßt aber mit 49 Arten mehr mono- und biverticillate Arten und enthält sehr charakteristische Zeichnungen der Konidienträger. (s. a. Gams, 1993).

Für die terverticillaten Arten der/des *P. aurantiogriseum*-Gruppe/-Komplex (Svendsen and Frisvad, 1994) müssen in der Regel chemotaxonomische Methoden zur Differenzierung angewandt werden. Auch in der Sektion *Biverticillium* ist es hilfreich, die Identifizierung durch chemotaxonomische Untersuchungen zu bestätigen (Fischer *et al.* 2002). Die Identifizierung der biverticillaten Penicillien (Subgenus *Biverticillium*) ist häufig wegen des Vorkommens von intermediären² Isolaten recht schwierig, und befindet sich z.Z. in Bearbeitung (pers. comm. E. Hoekstra, 2000). Die Identifizierung von Arten der *P. aurantiogriseum* Gruppe sollte nur von Spezialisten durchgeführt werden, weil mikro-morphologische Unterschiede nur bei wenigen dieser Arten ausgeprägt sind und Unterschiede in der Koloniemorphologie, Pigmentierung und Konidien-Farbe sehr schwierig zu beurteilen sind. Eine Bestimmung von Arten wie z.B. *P. crustosum*, *P. commune*, *P. solitum*, *P. verrucosum* oder *P. aurantiogriseum*, *P. cyclopium*, *P. polonicum*, und *P. viridicatum* ist für Mykologen mit begrenzter Erfahrung in der *Penicillium* Systematik nicht verlässlich, sofern lediglich morphologische Merkmale zu Grunde gelegt werden. Chemotaxonomische Untersuchungen des Mykotoxinspektrums sind sehr hilfreich, machen jedoch eine analytische Ausstattung notwendig.

Literatur

² intermediär: das Isolat zeigt Merkmale von zwei Arten und ist daher nur sehr schwer zuzuordnen.

- Domsch, K.H., Gams, W., and Anderson, T.-H.: Compendium of soil fungi. Reprint, IHW-Verlag, Eching, Germany (1993)
- Fischer, G. and Dott, W. Quality assurance and good laboratory practice in the mycological laboratory - compilation of basic techniques for the identification of fungi. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205 (6), pp. 433-442 (2002)
- Fischer, G., Braun, S., and Dott, W. Profiles of microfungi - *Penicillium chrysogenum* and *P. expansum*. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206 (1), pp. 65-67 (2003)
- Gams, W.: Supplement and corrigendum to the Compendium of soil fungi. IHW-Verlag, Eching, Germany (1993)
- Klich, M.A. Identification of common *Aspergillus* species (1st Edition). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands (2002)
- Pitt, J.I. The Genus *Penicillium*, Academic Press, Sydney (1979)
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D.: Fungi and Food Spoilage. Academic Press, Sydney (1985)
- Pitt, J. I.: A laboratory guide to common *Penicillium* species (2nd Edition). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization CSIRO, Division of Food Research and Processing, North Ryde, N. S. W, ISBN 0-643-05837-5 (1988)
- Raper, K.B. and Fennell, D.T.: The Genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Company, Baltimore (1977)
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., and Filtenborg, O.: Introduction to food-borne fungi (4th Edition). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands (1995)
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., and Filtenborg, O.: Introduction to food- and airborne fungi (6th / 7th Edition). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands (2000 / 2004)
- Svendsen, A. and Frisvad, J.C.: A chemotaxonomic study of the terverticillate penicillia based on high performance liquid chromatography of secondary metabolites. *Mycol. Res.* 98, 1317-1328 (1994)

Aspergillus fumigatus

- Stichwort: *Biotonne, Kompost*
- Morphologie: grau-grüne Kolonie (evtl. leicht bräunlich, bläulich), Konidienträger columnar
- Mikroskopie: Konidiophoren glatt, Vesikel breit keulenförmig, Konidien rauh-wandig bis echinulat, schnell wachsend (37 °C), uniseriat
- Pathogenität: Toxinproduzent, Gliotoxin, Verruculogen, Fumitremorgene
- Habitat: Häufig in Cerealien (wenn erhitzt), vor allem im Müll, Kompost
- Ähnliche Arten: nach Schlüssel: evtl. mit *A. clavatus* zu verwechseln

Aspergillus ustus

- Stichwort: (*Hausstaub*)
- Morphologie: erst weiss-creme, dann oliv-graue Kolonie, schnell wachsend (4,5 - 6,0 cm in 7 Tagen), radiäre Konidienköpfchen, Sklerotien v.a. bei Frischisolaten
- Mikroskopie: Konidiophoren bräunlich (bis 400µm, kürzere im Luftmyzel), bi- und uniseriat; Hüllezellen unregelmäßig geformt, Konidien rund, echinulat, 3 - 4,5 µm,
- Pathogenität: Toxinproduzent: Austamide, Austocystine
- Habitat: Häufig im Boden, in Cerealien und Erdnüssen
- Ähnliche Arten: evtl. *A. tamaritii* (mit rauhen Konidienträgern)

Aspergillus versicolor

- Stichwort: *Hausstaub*
- Morphologie: dkl. blaugrüne Kolonien (evtl. leicht gelblich), anfangs weiß; langsam wachsend (1,0 - 2,0 cm in 7 Tagen); Rückseite: orange-gelblich bis braun;
- Mikroskopie: Konidiophoren glatt, hyalin, Konidien echinulat, 2 - 3,5 µm; dick-wandige „Hülle“-Zellen manchmal vorhanden
- Pathogenität: Toxinproduzent:
Sterigmatocystin
- Habitat: Häufig in Lebensmitteln, Innenraum: Käse, Getreide, Gewürze, trockenes Fleisch
- Ähnliche Arten: *A. sydowii*: dieser mit ‚Delft‘-blauer Konidienfarbe

Emericella nidulans

- Stichwort:
- Morphologie:
Innenraum
dkl.-grüne Kolonie (evtl. leicht gelblich) mit weißem Rand; schnell wachsend (4,5 - 6,0 cm in 7 Tagen); *Rückseite*: oliv - purpurbraun; Ascomata cremefarben;
- Mikroskopie:
Konidiophoren glatt, bräunlich, 60 - 130 µm, Konidien rauh, 3 - 3,5 µm; Ascomata umgeben von Hyphen mit runden dick-wandigen „Hülle“-Zellen, Ascosporen linsenförmig mit 2 equatorialen Leisten
- Pathogenität:
Infektiös, Toxinproduzent:
Sterigmatocystin, Penicillin
- Habitat:
Häufig in Lebensmitteln,
Innenraum, Kompost
- Ähnliche Arten:
3 weitere Arten von Emericella, die bei Raper und Fennell als Varietäten geführt sind

Penicillium chrysogenum

- Stichwort: *Innenraum, Penicillin*
- Morphologie: gelbgrün bis hell blau-grün, schnell-wachsend, Kolonien flach, samtig, gelbes Exudat (Name!)
- Mikroskopie: Konidiophoren terverticillat, unregelmäßig verzweigt, Seitenzweige eher abgespreizt, glatt, Konidien glattwandig, subglobos bis ellipsoid
- Pathogenität: Toxinproduzent: Penicillin, Roquefortin C, Meleagrinen
- Bedeutung: Innenraum-Kontaminationen
- Ähnliche Arten: *evtl. P. expansum*

Penicillium citrinum

- Stichwort: *Gewürze*
- Morphologie: blau-grüne Kolonie, 1 - 1,5cm in 7 Tagen, Reverse gelb-orange
- Mikroskopie: Konidiophoren glatt, Konidien glatt, langsam wachsend, biverticillat, furcat
- Pathogenität: Toxinproduzent, Citrinin
- Bedeutung: Häufig in tropischen Cerealien und Gewürzen
- Ähnliche Arten: *P. steckii* (Reverse weiss)

Penicillium crustosum

- Stichwort: *Bioabfall, Kompost*
- Morphologie: graugrüne Kolonien, schnellwachsend, 3 -4 cm in 7 Tagen, Kolonie mit krustenförmiger Konidien-schicht; Reverse creme bis gelb-braun
- Mikroskopie: Konidiophoren terverticillat, deutlich rauh, angedrückt; Konidien glattwandig, kugelig bis subglobos, 3,5 - 4 µm Durchmesser
- Pathogenität: Toxinproduzent: Penitrem A
- Bedeutung: häufig in ölhaltigen Samen und Nüssen, gelegentlich auf Käse
- Ähnliche Arten: alle Arten der *P. aurantiogriseum-Gruppe*

Penicillium expansum

- Stichwort: *Apfelfäule, Geruch: Äpfel*
 - Morphologie: gelb bis blau-grün, schnellwachsend (4-5 cm in 7 Tagen), locker synnematisch
 - Mikroskopie: Konidiophoren terverticillat, regelmäßig verzweigt, Seitenzweige angedrückt an die Hauptachse, glatt, Konidien glattwandig, subglobos bis ellipsoid
 - Pathogenität: Toxinproduzent: Patulin, Roquefortin, Citrinin
 - Bedeutung: verantwortlich für Apfelfäule, auch auf Nüssen
- Ähnliche Arten: *evtl. P. chrysogenum*

Penicillium glabrum

- Stichwort: *Bioabfall, Innenraum*
- Morphologie: graugrün bis dkl. oliv-grün, schnell-wachsend, 4 - 5 in 7 Tagen; Kolonien flach, samtig, Reverse gelb bis gelb-orange
- Mikroskopie: Konidiophoren monoverticillat, glatt bis fein rauh, Konidien glatt- bis fein rauhwandig, globos bis subglobos
- Pathogenität: Erreger der Suberosis („Korkarbeiter-Lunge“)
- Bedeutung: Innenraum, Bioabfall; getrocknete Früchte, Fruchtsäfte
- Ähnliche Arten: *einige Autoren unterscheiden P. spinulosum von P. glabrum (echinulate Sporen, andere Koloniemorphologie)*

Penicillium variable

- Stichwort: *„Konidienform‘ variabel*
- Morphologie: gelbliches Myzel, Konidiophoren am Luftmyzel, Sporulation grau, 1 - 1,5 in 7 Tagen; Reverse gelb bis orange-braun
- Mikroskopie: Konidiophoren biverticillat, glatt, Konidien glatt- bis fein rauhwandig, ellipsoid bis fusiform
- Pathogenität: Toxinproduzent. Rugulosin
- Bedeutung: Lebensmittel
- Ähnliche Arten: evtl. andere Biverticillate mit gelblichem Myzel

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Guido Fischer, Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Juniorprofessur „Umwelt-
hygiene – Mykologie und biogene Umwelttoxine“, Universitätsklinikum, RWTH Aachen,
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen, Tel. 0241 80-88876, FAX 0241 80-82477, e-mail

Guido.Fischer@post.rwth-aachen.de