

**Tätigkeitsbericht des
Nationalen Referenzzentrums
für Invasive Pilzinfektionen (NRZMyk)
2014**



**Nationales Referenzzentrum für Invasive Pilzinfektionen (NRZMyk)
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung
und Infektionsbiologie e. V. – Hans-Knöll-Institut Jena
Adolf-Reichwein-Str. 23
07745 Jena
www.nrz-myk.de**

27. März 2015

Mitarbeiterverzeichnis

Name	Funktion	Telefon 03641-532 ...	E-Mail
Prof. Dr. med. Oliver Kurzai	Leiter	1551	oliver.kurzai@hki-jena.de
PD Dr. rer. nat. Kerstin Voigt	Stellv. Leiterin Labor	1395	kerstin.voigt@hki-jena.de
Prof. Dr. med. Marie von Lilienfeld-Toal	Stellv. Leiterin klinische Beratung	1720	marie.von_lilienfeld-toal@med.uni-jena.de
Dr. rer. nat. Kerstin Kaerger (ab 09/2014 Mutterschutz/Elternzeit)	PostDoc		
Dr. rer. nat. Grit Walther	PostDoc	1038	grit.walther@hki-jena.de
Alexandra Köhler	TA	1582	alexandra.koehler@hki-jena.de
Christiane Weigel	TA	1111	christiane.weigel@hki-jena.de

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
AMB	Amphotericin B
Ani	Anidulafungin
AsPIRS	<i>Aspergillois Intrinsic Risk Stratification Study</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAS	Caspofungin
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CYP51A	14 α -sterol Demethylase Gen
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DHPS	Dihydropteroat-Synthase
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> - Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EF1alpha	Elongation Faktor 1 alpha
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FFSC	<i>Fusarium fujikuroi</i> species complex
FOSC	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex
FSSC	<i>Fusarium solani</i> species complex
FKS	1,3-Beta-D-Glucan-Synthase 1
HKI	Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll- Institut Jena
HS	Hotspot Region
ITR	Itraconazol
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
JMRC	<i>Jena Microbial Resource Collection</i>
LSU	<i>large subunit</i>
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
ÖGD	Öffentlicher Gesundheitsdienst
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
POS	Posaconazol
RAPDs	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLPs	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ribonukleinsäure
TEF	Translationselongationsfaktor 1alpha
Terb	Terbinafin
VOR	Voriconazol

Zusammenfassung

Im ersten Jahr seines Bestehens am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut Jena (HKI) konnte sich das NRZMyk als nationaler Ansprechpartner für Fragen zur Diagnostik, Therapie und klinischem Management von invasiven Pilzinfektionen etablieren. Über die Beratung per Telefon und Email hinaus wurden 2014 insgesamt 78 Proben bearbeitet. Die Speziesidentifizierung erfolgt generell mittels sequenzbasierter Methoden. Für eine sichere Artbestimmung seltener Erreger wurden aufgrund der teilweise unklaren taxonomischen Einordnung Alignments geeigneter Markersequenzen durchgeführt. Alle identifizierten Stämme werden in die Stammsammlung des NRZMyk, die Jenaer Mikrobenstammsammlung *JMRC*, aufgenommen. Neben der Speziesidentifizierung wurden für die Mehrzahl der Fälle phänotypische Resistenztests für alle gängigen Antimykotika durchgeführt. Das NRZMyk ist eine der wenigen Einrichtungen in Deutschland, die eine Testung nach den EUCAST-Referenzprotokollen anbieten. Bei identifizierten Antimykotikaresistenzen wurde prinzipiell auf das Vorhandensein von Mutationen in relevanten Zielgenen untersucht. Zur Feintypisierung von Erregern - besonders bei Ausbruchsfragestellungen - kommen am NRZMyk verschiedene PCR und Sequenz basierte Methoden zum Einsatz.

In Forschungsprojekten wurde in Kooperation mit dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg und dem Pasteur-Institut Paris Multilokus-Sequenztypisierungen von 95 *Candida albicans*-Blutstromisolaten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine große genetische Heterogenität der untersuchten klinischen Isolate, eine nosokomiale Übertragung konnte nicht nachgewiesen werden. In einem DFG geförderten Forschungsvorhaben wird die taxonomische Struktur der Gattung *Mucor* analysiert (DFG WA 3518/1-1). Weitere intensive Kooperationen bestehen insbesondere mit dem *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) Fungal Biodiversity Centre in Utrecht (Sybren de Hoog), dem Spanischen Zentrum für Mikrobiologie in Madrid (Ana Alastruey-Izquierdo) und den österreichischen Referenzzentralen (Cornelia Lass-Flörl, Innsbruck und Birgit Willinger, Wien). Aufgrund seiner taxonomischen Expertise ist das NRZMyk seit September 2014 Referenzlabor für den Ringversuch „Schimmelpilze“ des Landesgesundheitsamtes Baden Württemberg und steht auf diese Weise im engen Austausch mit DSMZ in Braunschweig und dem CBS in Utrecht. Das NRZMyk ist darüber hinaus beteiligt an der Erstellung von Leitlinien in Kooperation mit der DMykG und der AGIHO.

Summary

In the first year of its appointment, the NRZMyk at the Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knoell Institute Jena could be established as national contact for questions on diagnosis, therapy and clinical management of invasive fungal infections. In addition to the consultations by phone and email a total of 78 samples have been processed by the NRZMyk in 2014. In general, species identification takes place by using sequence based methods. For a species identification of rare pathogens alignments of suitable marker sequences are performed to tackle the sometimes unresolved taxonomic structure of rare groups of fungal pathogens. All identified strains are stored in the stock collection of the NRZMyk, the Jena Microbial Resource Collection *JMRC*. Besides species identification, phenotypic susceptibility testing for all commonly used antimycotics are performed in the majority of the cases. The NRZMyk is one of the few institutions in Germany that offers a testing according to the EUCAST-reference protocols. Generally, in cases of phenotypic resistance, relevant target genes are analysed for mutations. Fine typing of pathogens – especially in cases of outbreaks – is done by using various PCR and sequence based methods.

In a collaborative research project with the Institute of Hygiene and Microbiology of the University Wuerzburg and the Pasteur-Institute Paris multilocus-sequence typing of 95 *Candida albicans* – blood stream isolates revealed a great genetic heterogeneity of the examined clinical isolates without evidence for nosocomial transmission. Furthermore, in a DFG funded project the taxonomic structure of *Mucor* is revisited (DFG WA 3518/1-1). The NRZMyk has intensive cooperations with the *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) Fungal Biodiversity Centre in Utrecht (Sybren de Hoog), the Spanish Center for Microbiology in Madrid (Ana Alastruey-Izquierdo) and the National Reference Centers in Austria (Cornelia Lass-Floerl, Innsbruck and Birgit Willinger, Vienna). Because of its taxonomic expertise the NRZMyk has been selected as reference laboratory for the ring trial “indoor mould fungi” of the Health Authority Baden Wuerttemberg since 2014 and is by this means in close exchange with the DSMZ in Braunschweig and the CBS in Utrecht. The NRZMyk is furthermore involved in establishing guidelines in cooperation with the DMykG and the AGIHO.

1. Entwicklung bzw. Verbesserung diagnostischer Verfahren, Koordination bei der Standardisierung und Verbreitung allgemeingültiger Testverfahren, Initiierung von Untersuchungen zur Qualitätssicherung.

Die Speziesidentifizierung der Erreger invasiver Mykosen erfolgt am NRZMyk mittels sequenzbasierter Verfahren. Standardmäßig werden Sequenzierungen von geeigneten Markergenen durchgeführt, die in der Mehrzahl der Fälle eine Artdifferenzierung der Isolate erlauben (Tab. 1).

Die Taxonomie vieler Pilzgruppen einschließlich klinisch relevanter Gattungen wie *Aspergillus*, *Fusarium* oder *Trichosporon* ist derzeit im Wandel, was sich in einer großen Zahl von Neubeschreibungen und Umkombinationen äußert. Sequenzvergleiche durch eine einfache BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)-Suche in Online-Sequenzdatenbanken wie *GenBank* führen daher immer häufiger zu ungenauen Ergebnissen. Gründe dafür sind der hohe Anteil an Fehlbestimmungen, die uneinheitliche Nomenklatur und die fehlende Korrektur von Namen nach Umbenennungen. Voraussetzung für eine exakte, dem aktuellen Stand der Taxonomie entsprechende Artbestimmung sind deshalb Alignments der für die jeweilige Pilzgruppe geeigneten Marker, die die Typus-Sequenzen aller bekannten Arten enthalten und die intraspezifische Variabilität der Arten anhand von publizierten Referenzsequenzen widerspiegeln. Das NRZMyk hat 2014 derartige Alignments für Erreger invasiver Mykosen enthaltende Taxa (Gattungen, Sektionen, Artkomplexe) zusammengestellt und gewährleistet so eine zuverlässige, dem neuesten taxonomischen Stand entsprechende Artbestimmung. Die für die Artbestimmung verwendeten Alignments und Marker sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: Ausgewählte Makergene für die Speziesbestimmung von klinischen Isolaten.

Alignment	Marker
<i>Acremonium sensu lato</i>	ITS und 28S D1/D2 Domäne (LSU)
<i>Aspergillus</i> Sektion <i>Fumigati</i>	Beta-Tubulin und ITS
<i>Aspergillus</i> Sektion <i>Nidulantes</i>	Beta-Tubulin
<i>Aspergillus</i> Sektion <i>Nigri</i>	Beta-Tubulin
<i>Aspergillus</i> Sektion <i>Terrei</i>	Beta-Tubulin
<i>Aspergillus</i> Sektion <i>Usti</i>	Beta-Tubulin
<i>Aspergillus</i> Sektion <i>Versicolores</i>	Beta-Tubulin
<i>Candida</i>	ITS
<i>Exophiala</i>	ITS
<i>Fusarium fujikuroj</i> Artkomplex	Translationelongationsfaktor 1alpha (TEF)
<i>Fusarium oxysporum</i> Artkomplex	Translationelongationsfaktor 1alpha (TEF)
<i>Fusarium solani</i> Artkomplex	Translationelongationsfaktor 1alpha (TEF)
<i>Lichtheimia</i>	ITS
<i>Mucor circinelloides</i> Artkomplex	ITS
<i>Rhizopus</i>	ITS
<i>Trichosporon</i>	ITS
<i>Trichosporon asahii</i> Artkomplex	Intergeneric spacer-Region (IGS)

In 2014 wurden im NRZMyk insgesamt 78 eingesandte Proben bearbeitet. Darunter waren 18 klinische Proben, die auf -humanpathogene Pilze untersucht wurden, und 60 Vitalstämme, die unter Anwendung der oben beschriebenen molekularen Methodiken identifiziert wurden. Die Leistungsdaten sind im Detail in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Leistungsdaten des NRZMyk für das Jahr 2014.

Anzahl der bearbeiteten Proben insgesamt	78
a) Anzahl der klinischen Proben	18
davon:	
Gewebeproben - frisch	5
Gewebeproben - Parafin-Präparate	4
BAL	3
Liquor	2
Punktate	2
Ausstrich-Präparate	1
DNA-Extrakt	1
b) Anzahl der identifizierten Vitalstämme	60
<i>Aspergillus flavus</i>	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	15
<i>Aspergillus nidulans</i>	2
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	1
<i>Blastobotrys adenivorans</i>	1
<i>Candida albicans</i>	4
<i>Candida glabrata</i>	4
<i>Candida krusei</i>	2
<i>Candida parapsilosis</i>	4
<i>Cladophialophora sp. nov.</i> (Artbeschreibung in Vorbereitung.)	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> Komplex	1
<i>Exophiala dermatitidis</i>	2
<i>Lecanicillium attenuatum</i>	1
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	1
<i>Fusarium petroliphilum</i>	3
<i>Fusarium proliferatum</i>	1
<i>Fusarium solani</i> Komplex (FSSC5)	1
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	1

<i>Malassezia furfur</i>	1
<i>Papulaspora sp.</i>	1
<i>Phialosimplex sclerotialis</i>	2
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Syn. <i>Paecilomyces lilacinus</i>)	5
<i>Scedosporium apiospermum</i> (Tel. <i>Pseudoallescheria apiosperma</i>)	1
<i>Trichosporon asahii</i>	1
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	1
Anzahl der Proben mit Antimykogramm	42
Anzahl der molekularen Resistenztestungen/Anzahl der nachgewiesenen Mutationen:	
<i>Aspergillus fumigatus</i> , P450-Sterol-14-Demethylase-Gen (cyp51A)	3/1
<i>Pneumocystis jirovecii</i> , Dihydropteroat-Synthase (DHPS) und Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)	1/0
<i>Candida glabrata</i> , 1,3-Beta-D-Glucan-Synthase (FKS1 und FKS2)	1/1
Anzahl der durchgeführten Subtypisierungen bei Verdacht auf Ausbruchssituationen	2

2. Über die Routine hinausreichende Diagnostik und Feintypisierung von Erregern einschließlich molekularbiologischer Untersuchungen zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge.

Im Jahr 2014 wurde im NRZMyk kein Fall eines Ausbruchsgeschehens mit invasiven pilzlichen Erregern identifiziert. In zwei Fällen bestand der Verdacht auf eine Ausbruchssituation für die entsprechende Subtypifizierungen durchgeführt wurden (siehe Tab. 2).

Zur Feintypisierung von Erregern bei Ausbruchsfragestellungen kommen am NRZMyk verschiedene PCR- und Sequenz-basierte Methoden zum Einsatz. Dazu gehören RFLPs (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus), RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA) und Mikrosatelliten-PCR und Multilokus-Sequenztypisierung (MLST).

In einem Projekt mit dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg und dem Pasteur-Institut Paris untersuchte das NRZMyk die genetische Variabilität von 95 Blutstrom-Isolaten von *Candida albicans*, die in einem Zeitraum von 8 Jahren an der Universität Würzburg isoliert wurden. Multilokus-Sequenztypisierungen ergaben eine große genetische Heterogenität der Isolate. Nosokomiale Übertragungen wurden nicht nachgewiesen. Die Ergebnisse der Studie mündeten in einem Manuskript, das kürzlich zur Veröffentlichung im *International Journal of Medical Microbiology* akzeptiert wurde. (Huyke J, Martin R, Walther G, Weber M, Kaerger K, Bougnoux M-E, Elias J, Kurzai O. *Candida albicans* bloodstream isolates in a German university

hospital are genetically heterogenous and susceptible to commonly used antifungals. *IJMM*, akzeptiert).

3. Führen einer Stammsammlung und Abgabe von Referenzstämmen bzw. von diagnostikspezifischen Referenzpräparaten.

Die Jenaer Mikroorganismensammlung (*Jena Microbial Resource Collection/JMRC*) ist eine fusionierte Stammsammlung lebender Mikroorganismen des Leibniz-Instituts für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut und der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die am HKI lokalisierte Sammlung umfasst insgesamt ca. 15.000 Pilze und 35.000 Bakterien. Diese Sammlung wurde zur Stammsammlung des NRZMyk ausgebaut.

Alle 2014 zum NRZMyk gesandten Stämme wurden in die JMRC aufgenommen und stehen auf Anfrage für diagnostische und wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung.

4. Aufbau und koordinierende Pflege eines Netzwerks diagnostischer Einrichtungen.

Das NRZMyk hat 2014 mit dem Aufbau eines nationalen Netzwerkes aus diagnostischen Einrichtungen, insbesondere Mikrobiologische Institute an Universitätskliniken, begonnen und Newsletter über aktuelle Informationen auf dem Gebiet invasiver Pilzinfektionen versendet (Stellungnahme zu den EUCAST Breakpoints für Echinocandine, siehe Anhang). In den meisten universitären mikrobiologischen Instituten stehen bereits Ansprechpartner für klinisch-mykologische Untersuchungen zur Verfügung.

Im Gegensatz zu anderen Infektionskrankheiten, bei denen der Labordiagnostik eine alleinentscheidende Rolle zukommt, sind bei invasiven Mykosen klinische Parameter oft von entscheidender diagnostischer Bedeutung. Daher nutzt das NRZMyk auch ein etabliertes Netzwerk aus klinischen Partnern mit umfassender Expertise in der Diagnostik und Therapie von Pilzinfektionen, das im Rahmen der europaweiten Multizenterstudie AspIRS¹ (Leiter: O. Kurzai, stellv. Leiter: J. Löffler [assoziierter Partner]) aufgebaut wurde (vgl. Tab. 3). Nicht zuletzt für die Implementierung und Evaluierung neuer diagnostischer Verfahren, die nur in enger Kooperation mit den betreuenden Klinikern möglich ist, ist dieses Netzwerk für das NRZMyk von entscheidender Bedeutung.

Tab. 3.: Klinische Partner in AspIRS

Institution	Verantwortliche Partner
Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universität Würzburg	Dr. Werner Heinz
Universitätsklinikum Dresden	Dr. Martin Wermke

¹ AspIRS – *Aspergillus intrinsic risk stratification* – Studie: eine genomweite Assoziationsstudie zur Identifizierung von Risikomarkern für invasive Aspergillose bei stammzelltransplantierten Patienten.

Universitätsklinikum Regensburg	Dr. Matthias Grube
Universitätsklinikum Köln	Dr. Maria Vehreschild
Universitätsklinikum Mannheim	Prof. Dieter Buchheidt
Allgemeines Krankenhaus Wien, Austria	Prof. Birgit Willinger
Karolinska Institute, Stockholm, Sweden	Prof. Lena Klingspor
Trinity College & Saint James Hospital, Dublin, Ireland	Prof. Tom Rogers
University of Leuven, Belgium	Prof. Johan Maertens
Universitätsklinikum Jena, Abteilung Hämatologie und Internistische Onkologie	Prof. A. Hochhaus
University Hospital of Wales, Cardiff, Wales	Prof. Lewis White
Medizinische Universität Innsbruck, Austria	Prof. Cornelia Lass-Flörl
Medizinische Universität Innsbruck, Austria	Prof. David Nachbaur
University of Perugia, Italy	Dr. Agostinho Carvalho
University Hospital of Leiden, Netherlands	Dr. Hetty Jolink
Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, MA	Dr. Michael Boeckh

5. Beratungstätigkeit für den Öffentlichen Gesundheitsdienst, Laboratorien, niedergelassene Ärzte, Kliniken und Forschungsinstitute. Durchführung von Weiterbildungen und Öffentlichkeitsarbeit.

Das NRZMyk ist nationaler Ansprechpartner für Ärzte und Mikrobiologen bei Fragen zur Diagnostik, Therapie und zum klinischen Management opportunistischer invasiver Pilzinfektionen. Im Jahr 2014 wurden insgesamt über 100 Beratungsleistungen vorwiegend telefonisch oder per E-Mail durchgeführt.

Seit April 2014 ist die Homepage des NRZMyk online (www.nrz-myk.de). Sie dient als Informationsmedium sowohl für Mediziner als auch für die breite Öffentlichkeit. Über die Homepage besteht die Möglichkeit, sich u.a. über die häufigsten Erreger invasiver Mykosen und den Aufgabenkatalog des NRZMyk zu informieren. Darüber hinaus steht ein Einsendefomular zur Einsendung von Probenmaterial zum Download zur Verfügung. Ein Newsletter wurde ebenfalls eingerichtet, für den man sich über die Homepage anmelden kann. Die Homepage dient außerdem als Plattform zur Ankündigung von mykologisch-relevanten Veranstaltung und Kursen.

6. Zusammenarbeit mit Referenzlaboratorien anderer Länder sowie den Kollaborationszentren der WHO einschließlich der Teilnahme an internationalen Ringversuchen.

Über die enge Zusammenarbeit mit den assoziierten Partnern des NRZMyk in Deutschland hinaus kooperiert das NRZMyk auch mit Referenzlaboratorien auf internationaler Ebene.

Von zentraler Bedeutung ist hier der intensive Austausch besonders auf dem Gebiet der Taxonomie der Gattung *Fusarium* und der Schwarzen Hefen mit der Arbeitsgruppe um Sybren de Hoog vom *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) Fungal Biodiversity Centre in Utrecht, NL. Eine enge Zusammenarbeit vor allem im Bereich der phänotypischen Antimykotika-Resistenztestung besteht mit Ana Alastruey-Izquierdo vom Spanischen Zentrum für Mikrobiologie in Madrid (*Spanish National Center for Microbiology*) und der Arbeitsgruppe um Cornelia Lass-Flörl vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Medizinischen Universität Innsbruck, die die Österreichische Referenzzentrale für *Aspergillus* und *Aspergillus*-Infektionen leitet.

Das NRZMyk fungiert seit September 2014 als Referenzlabor für den bundesweiten Ringversuch „Schimmelpilze“ des Landesgesundheitsamtes Baden Württemberg und steht auf diese Weise im wissenschaftlichen Austausch mit anderen pilztaxonomisch arbeitenden Instituten wie der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig und dem *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) Fungal Biodiversity Centre in Utrecht, NL.

7. In Abstimmung mit dem Robert Koch-Institut Auswertung und Interpretation der Daten mit dem Ziel, die epidemiologische Situation möglichst repräsentativ für Deutschland zu beschreiben. Initiierung von und Mitarbeit bei Surveillanceprojekten.

Die in 2014 erfassten Daten lassen noch keine Auswertung zu, um statistisch signifikante Rückschlüsse auf die epidemiologische Situation in Deutschland ziehen zu können.

8. Überwachung der eingehenden Daten mit dem Ziel der zeitnahen Aufdeckung von Ausbrüchen oder Ausbruchsgefahren sowie umgehende Mitteilung an das Robert Koch-Institut. Unterstützung des Öffentlichen Gesundheitsdienstes und des RKI bei ergänzenden Untersuchungen im Rahmen von Ausbruchsuntersuchungen.

Für die Beurteilung von Ausbruchsgeschehen der Gesundheitsämter werden den ÖGD und dem Robert Koch-Institut auf Anfrage zeitnah alle notwendigen Informationen zur Verfügung gestellt. Im Fall der Meldung nosokomialer Ausbrüche invasiver Mykosen kann das NRZMyk dem ÖGD und dem meldenden Klinikum beratend zur Seite stehen.

9. Epidemiologische Analyse und Bewertung der Resistenz- und Virulenzentwicklung

Das NRZMyk führt für die Mehrheit der eingehenden Isolate phänotypische Resistenztestungen durch. Diese wurden 2014 von dem kommerziell erhältlichen Etest auf den vom *European*

Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) empfohlenen Mikrodilution-Tests umgestellt. Eine besondere Resistenzproblematik besteht bei klinischen Isolaten der Gattung *Fusarium*. Die Ergebnisse der Resistenztestung mittels Mikrodilution-Test für die identifizierten *Fusarium*-Spezies sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4: MHK-Werte der identifizierten *Fusarium*-Spezies mittels Mikrodilution-Test.

NRZ-Nr.	Art-komplex	AMB	VOR	Ani	CAS	Herkunft
2014-10	FSSC	1	8	>8	>8	Blutkultur
2014-69	FSSC	2	8	>8	>8	Auge
2014-13	FSSC	1	>8	>8	>8	Auge
2014-22	FSSC	2	8	>8	>8	Auge
2014-79	FSSC	2	4	>8	>8	Auge
2015-35	FSSC	1	>8	>8	>8	Auge
2015-02	FSSC	1	1	>8	>8	Auge
2014-19	FSSC	1	4	>8	>8	Wundabstrich
2014-36	FOSC	1	4	>8	>8	Auge
2014-34	FFSC	1	8	>8	>8	Auge
2015-13	FFSC	2	2	>8	>8	Blutkultur
2015-34	FFSC	4	2	>8	>8	Blutkultur

Abk. verwendeter Antimykotika: AMB (Amphotericin B), Terb (Terbinafin), ITR (Itraconazol), POS (Posaconazol), VOR (Voriconazol), Ani (Anidulafungin), CAS (Caspofungin), FSSC (*Fusarium solani* species complex), FFSC (*Fusarium fujikuroi* species complex), FOSC (*Fusarium oxysporum* species complex)

Isolate, die im Mikrodilution-Test deutlich erhöhte MHK (Minimale Hemmkonzentration)-Werte aufweisen, werden auf das Vorhandensein von Mutationen in den Zielgenen der entsprechenden Antimykotika untersucht. Die Zielgene mit den dazugehörigen Primern der jeweiligen Art sind in Tabelle 5 aufgeführt. So wurde 2014 das P450-Sterol-14-Demethylase-Gen (*cyp51A*) von drei *Aspergillus fumigatus*-Isolaten mit erhöhten MHKs für die Azole sequenziert. In einem der Isolate wurde eine Mutation im *cyp51A* nachgewiesen. Für einen Stamm von *Candida glabrata* mit Echinocandin-Resistenz wurde die Hotspot-Regionen des Gens für die 1,3-Beta-D-Glucan-Synthase (FKS1 und FKS2) sequenziert und auch hier konnte eine Mutation für dieses Gen nachgewiesen werden (Tab. 6). Bei dem nicht kultivierbaren Erreger *Pneumocystis jirovecii* ist die Resistenztestung nur molekular möglich. Das NRZMyk führte 2014 eine solche Testung mittels partieller Sequenzierung der Gene für die Dihydropteroat-Synthase (DHPS) und der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), wies aber keine Mutation nach. In 2014 wurde eine Stellungnahme zu den EUCAST Breakpoints für Echinocandine herausgegeben (siehe Anhang).

Tab. 5: Zielgene der jeweiligen Arten, die bei vorliegender Antimykotikaresistenz auf Mutationen untersucht werden.

Art	Zielgen/Region	Primer
<i>Aspergillus fumigatus</i>	14 α -Sterol-Demethylase (<i>CYP51A</i>)	CYP1-L/CYP1-R/CYP2-L/CYP2-R/CYP3-L/CYP3-R
<i>Candida albicans</i>	1,3-Beta-D-Glucan-Synthase 1 (<i>FKS1</i>), Hotspot 1	GSC1f_450/GSC1r_450
<i>Candida albicans</i>	1,3-Beta-D-Glucan-Synthase 1 (<i>FKS1</i>), Hotspot 2	CAS2f_497/CAS2f_497
<i>Candida glabrata</i>	1,3-Beta-D-Glucan-Synthase 1 (<i>FKS1</i>), Hotspot 1	FKS1_HS1_f/FKS1_HS1_r/FKS1_HS1_s
<i>Candida glabrata</i>	1,3-Beta-D-Glucan-Synthase 1 (<i>FKS1</i>), Hotspot 2	FKS1_HS2_f/FKS1_HS2_r/FKS1_HS2_s
<i>Candida glabrata</i>	1,3-Beta-D-Glucan-Synthase 2 (<i>FKS2</i>), Hotspot 1	FKS2_HS1_f/FKS2_HS1_r/FKS2_HS1_s
<i>Candida glabrata</i>	1,3-Beta-D-Glucan-Synthase 1 (<i>FKS2</i>), Hotspot 2	FKS2_HS2_f/FKS2_HS2_r/FKS2_HS2_s
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Dihydropteroat-Synthase (<i>DHPS</i>)	Pk2/PSB1
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Dihydrofolat-Reduktase (<i>DHFR</i>)	FR01/FR634

Tab. 6: Identifizierte Mutationen in Resistenzassoziierten Target-Genen bei vorliegenden Antimykotikumresistenzen bei Isolaten der Spezies *Aspergillus fumigatus* und *Candida glabrata*.

NRZ-Nr.	Species	Zielgen	Mutationen (total/AS Austausch)	CAS	Ani	ITR	POS	VOR
2014-048	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>CYP51A</i>	non	0,5		3	0,125	0,25
2014-050	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>CYP51A</i>	non	0,38		3	0,032	0,19
2014-065	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>CYP51A</i>	4/2	>32		2	0,38	>32
2014-074	<i>Candida glabrata</i>	<i>FKS1</i> and <i>FKS2</i>	FKS1:2/0, FKS2:x/1	1,5	>1	>32		

Abk. verwendeter Antimykotika: CAS (Caspofungin), Ani (Anidulafungin), ITR (Itraconazol), POS (Posaconazol), VOR (Voriconazol)

10. Regelmäßige Berichterstattung sowie Beratung des Robert Koch-Instituts zu den entsprechenden Sachfragen und Mitwirkung bei der Erarbeitung von Empfehlungen des Robert Koch-Institutes für Diagnostik, Therapie und Prävention sowie allgemein in der angewandten Infektionsepidemiologie

Durch die fachliche Expertise der beteiligten Wissenschaftler und Kliniker ist eine Mitwirkung bei der Erarbeitung von Empfehlungen des Robert Koch-Institutes für Diagnostik, Therapie und Prävention jederzeit möglich.

Anhang

EUCAST Breakpoints für Echinocandine - Stellungnahme des NRZMyk

// 19. September 2014,

In den „EUCAST Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs“ (Version 7.0)“ veröffentlicht die EUCAST erneut Breakpoints für die Empfindlichkeitstestung von Echinocandin-Antimykotika bei *Candida spp.* [1] Obwohl diese Breakpoints schon zuvor bekannt waren [2], hat die neue Version zu Anfragen an das NRZMyk geführt. In einem Fall war eine Beendigung der Echinocandintherapie und eine Umstellung auf Fluconazol erfolgt, da der MHK Wert des *C. albicans* Isolates (bestimmt mit E-Test) bei 0,06 µg/ml lag.

Das NRZMyk stellt hierzu fest:

1. Die Breakpoints der EUCAST beruhen wesentlich auf epidemiologischen cut-off Werten (ECOFFs), die in Referenzlabors mittels der EUCAST Referenzmethodik bestimmt wurden². Zudem werden pharmakokinetische Daten und klinische Erfahrungen berücksichtigt. Eine Korrelation der MHK-Bestimmung nach dieser Methodik mit dem klinischen Therapieerfolg wurde nicht gezeigt, ein PK/PD Target auf Basis der EUCAST Daten existiert ebenfalls bislang nicht [2]. Zudem sind ECOFFs stark von der verwendeten Methodik abhängig und MHK-Verteilungen können in einzelnen diagnostischen Labors erheblich von den Verteilungen, die den EUCAST-Breakpoints zugrunde liegen, abweichen [4]. Der ECOFF Wert trennt eine natürliche, empfindliche Population (Wildtyp) von einer nicht-Wildtyp-Population. Durch die Einteilung nach ECOFFs können Verschiebungen der Empfindlichkeit innerhalb einer Population erkannt und somit Hinweise auf eine mögliche Resistenzentwicklung gewonnen werden. ECOFFs stellen jedoch keine klinischen Breakpoints dar; daher kann von diesen Grenzwerten nicht auf eine Therapiemöglichkeit geschlossen werden.

2. Das NRZMyk rät daher zur Zeit davon ab, allein aufgrund einer *in vitro* Resistenztestung gegen Echinocandine und einer Interpretation mittels EUCAST Breakpoints von einer leitliniengerechten Therapie systemischer *Candida*-Infektionen abzuweichen. Zurückhaltung bei der klinischen Interpretation empfehlen wir insbesondere für Labors, die andere Testverfahren als den EUCAST Standard verwenden oder technisch bedingt generell höhere MHK-Werte beobachten, als die den EUCAST Breakpoints zugrundeliegenden MHK-Wert Verteilungen [2,4]. Solche Verschiebungen der Verteilung von MHK-Werten werden regelmäßig und auch in anerkannten Referenzlabors beobachtet⁴. Die Anwendung der EUCAST-Grenzwerte ist jedoch nicht sinnvoll, wenn die laborinterne MHK-Verteilung von den Referenzverteilungen abweicht [2,4]. Eine Echinocandinresistenz ist bei den Spezies, die allgemein als empfindlich gelten [3], zur Zeit sehr selten. Charakterisierte Isolate mit Mutationen im FKS1/2 Gen zeigen meist Anidulafungin MHKs von 0,125 µg/ml und höher [4].

3. Aufgrund der unklaren Datenlage sollte bei *Candida spp.* Isolaten mit erhöhter MHK grundsätzlich eine genotypische Charakterisierung der zugrunde liegenden Mutationen angestrebt werden. Diese molekulare Charakterisierung wird ebenso wie eine Referenztestung gegen

Anidulafungin am NRZMyk als wissenschaftliche Dienstleistung kostenfrei angeboten. Wir bitten alle Labors um die Einsendung solcher Stämme an das NRZMyk unter Nutzung des Einsendeformulars (www.nrzmyk.de).

[1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Antifungal Agents, Breakpoint tables for interpretation of MICs, version 7.0, valid from 2014-08-12. <http://www.eucast.org>

[2] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Anidulafungin: Rationale for the clinical breakpoints, version 2.0, 2013. <http://www.eucast.org>

[3] z.B. *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*

[4] Arendrup et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2010, 54:426-439.

<http://www.nrz-myk.de/newsticker/eucast-breakpoints-fuer-echinocandine-stellungnahme-des-nrzmyk.html>

Publikationsverzeichnis

2014 veröffentlichte Publikationen mit Bezug zum NRZMyk

-keine-

2014 veröffentlichte weitere Publikationen der Arbeitsgruppe

Wartenberg A, Linde J, Martin R, Schreiner M, Horn F, Jacobsen ID, Jenull S, Wolf T, Kuchler K, Guthke R, **Kurzai O**, Forche A, d'Enfert C, Brunke S, Hube B (2014) Microevolution of *Candida albicans* in macrophages restores filamentation in a nonfilamentous mutant
PLoS Genet :e1004824

Ekanev M, Otto G, Sossdorf M, Sponholz C, Boehringer M, Loesche W, Rittirsch D, Wilharm A, **Kurzai O**, Bauer M, Claus R (2014) Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation
Crit Care **18(5):543**

Lothar J, Breitschopf T, Krappmann S, Morton CO, Bouzani M, **Kurzai O**, Gunzer M, Hasenberg M, Einsele H, Loeffler J (2014) Human dendritic cell subsets display distinct interactions with the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*
Int J Med Microbiol **304(8):1160-8**

Cunha C, Kurzai O, Löffler J, Aversa F, Romani L, Carvalho A (2014) Neutrophil Responses to Aspergillosis: New Roles for Old Players
Mycopathologia **178(5-6):387-93**

Jacobsen ID, Lüttich A, **Kurzai O**, Hube B, Brock M (2014) In vivo imaging of disseminated murine *Candida albicans* infection reveals unexpected host sites of fungal persistence during antifungal therapy
J Antimicrob Chemother **69(10):2785-96**

Das Gupta M, Fliesser M, Springer J, Breitschopf T, Schlossnagel H, Schmitt AL, **Kurzai O**, Hünninger K, Einsele H, Löffler J (2014) *Aspergillus fumigatus* induces microRNA-132 in human monocytes and dendritic cells
Int J Med Microbiol **304(5-6):592-6**

Quintin J, Voigt J, Voort RV, Jacobsen ID, Verschueren I, Hube B, Giamarellos-Bourboulis EJ, Meer JW, Joosten LA, **Kurzai O**, Netea MG (2014) Differential role of NK cells against *Candida albicans* infection in immunocompetent or immunocompromised mice
Eur J Immunol **44(8):2405-14**

Cunha C, **Kurzai O**, Carvalho A (2014) PTX3 deficiency and aspergillosis
N Engl J Med **370(17):1666-7**

Miramón P, Dunker C, Kasper L, Jacobsen ID, Barz D, **Kurzai O**, Hube B (2014) A family of glutathione peroxidases contributes to oxidative stress resistance in *Candida albicans*
Med Mycol **52(3):223-39**

Hünninger K, Lehnert T, Bieber K, Martin R, Figge MT, **Kurzai O** (2014) A virtual infection model quantifies innate effector mechanisms and *Candida albicans* immune escape in human blood
PLoS Comput Biol **10(2):e1003479**

Cunha C, Aversa F, Lacerda JF, Busca A, **Kurzai O**, Grube M, Löffler J, Maertens JA, Bell AS, Inforzato A, Barbati E, Almeida B, Santos e Sousa P, Barbui A, Potenza L, Caira M, Rodrigues F, Salvatori G, Pagano L, Luppi M, Mantovani A, Velardi A, Romani L, Carvalho A (2014) Genetic PTX3 deficiency and aspergillosis in stem-cell transplantation
N Engl J Med **30;370(5):421-32**

Hentschel J, Müller U, Doht F, Fischer N, Böer K, Sonnemann J, Hipler C, Hünninger K, **Kurzai O**, Markert UR, Mainz JG (2014) Influences of nasal lavage collection-, processing- and storage methods on inflammatory markers--evaluation of a method for non-invasive sampling of epithelial lining fluid in cystic fibrosis and other respiratory diseases
J Immunol Methods **404:41-51**

Voigt J, Hünninger K, Bouzani M, Jacobsen ID, Barz D, Hube B, Löffler J, **Kurzai O** (2014) Human natural killer cells acting as phagocytes against *Candida albicans* and mounting an inflammatory response that modulates neutrophil antifungal activity
J Inf Dis **209(4):616-26**