

Tätigkeitsbericht des Nationalen Referenzzentrums für Invasive Pilzinfektionen (NRZMyk) 2014 - 2015



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

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde vom Robert Koch-Institut aus Mitteln des Bundesministerium für Gesundheit unter dem Förderkennzeichen 1369-240 gefördert.

Inhalt

Zusammenfassung	1
Summary	2
1. Entwicklung bzw. Verbesserung diagnostischer Verfahren, Koordination bei der Standardisierung und Verbreitung allgemeingültiger Testverfahren, Initiierung von Untersuchungen zur Qualitätssicherung.	3
2. Über die Routine hinausreichende Diagnostik und Feintypisierung von Erregern einschließlich molekularbiologischer Untersuchungen zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge.....	5
3. Führen einer Stammsammlung und Abgabe von Referenzstämmen bzw. von diagnostikspezifischen Referenzpräparaten.	8
4. Aufbau und koordinierende Pflege eines Netzwerks diagnostischer Einrichtungen.....	8
5. Beratungstätigkeit für den Öffentlichen Gesundheitsdienst, Laboratorien, niedergelassene Ärzte, Kliniken und Forschungsinstitute. Durchführung von Weiterbildungen und Öffentlichkeitsarbeit.	9
6. Zusammenarbeit mit Referenzlaboratorien anderer Länder sowie den Kollaborationszentren der WHO einschließlich der Teilnahme an internationalen Ringversuchen.	11
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.	12
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.	13
9. Epidemiologische Analyse und Bewertung der Resistenz- und Virulenzentwicklung	15
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	16
Anhang	
Publikationsverzeichnis	A1
Mitarbeiterverzeichnis	A3
Abkürzungsverzeichnis.....	A4
Arbeits- und Finanzplan für 2017-2019.....	A5

Zusammenfassung

Dem Nationalen Referenzzentrum für Invasive Pilzinfektionen (NRZMyk) ist es nach der Etablierung im Vorjahr gelungen, sich 2015 weiter zu einem zentralen Ansprechpartner in allen Fragen zu Diagnostik und Management invasiver Pilzinfektionen zu entwickeln. Dies ging einher mit dem Ausbau eines umfassenden nationalen Netzwerks aus diagnostischen Einrichtungen, das mittlerweile 70 einsendende Einrichtungen umfasst. Die Zahl der am NRZMyk bearbeiteten Proben hat sich von 78 im Vorjahr um >300% auf 239 erhöht. Alle eingesandten klinischen Isolate wurden molekular bestimmt und in der Mehrzahl der Fälle einer Resistenztestung mittels Mikrodilution (EUCAST) unterzogen. Alle Stämme wurden in die Stammsammlung des NRZMyk (*Jena Microbial Resource Collection* - JMRC) aufgenommen. Isolate aus der Sammlung wurden diagnostischen Einrichtungen auf Anfrage zur Verfügung gestellt. Neben der Bestimmung und Resistenztestung von Isolaten stellen molekularbiologische Erregernachweise aus diagnostischen Materialien einen Schwerpunkt der Tätigkeit dar. Dazu verfügt das NRZMyk über eine breite Palette an spezies- und gruppenspezifischen sowie über universelle PCRs.

Neben dem Angebot einer Referenzdiagnostik mit über die Routine hinausgehenden Methoden konnte das NRZMyk in 2015 seine Forschungsprojekte zur Entwicklung und Verbesserung diagnostischer und therapeutischer Verfahren wesentlich ausbauen. In einem DFG-geförderten Projekt erfolgt eine taxonomische Revision der *Mucoraceae* (DFG WA 3518/1-1). Gemeinsam mit Partnern aus Halle, Leipzig und Dresden wird in dem BMBF geförderten Verbundprojekt FINAR (Koordination: NRZMyk) die Entstehung von Azolresistenz bei *Aspergillus fumigatus* in der Umwelt analysiert. Darüber hinaus entwickelt das NRZMyk eine Online-Datenbank FunResDB, die es ermöglichen soll, Informationen zu Resistenzmutationen – zunächst im CYP51A-Gen von *Aspergillus fumigatus* – abzurufen. In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Heidelberg wurde die chemische Stabilität und antifungale Aktivität von Caspofungin Infusionslösungen untersucht.

Aufgrund seiner taxonomischen Expertise fungierte das NRZMyk auch 2015 als Referenzlabor für den bundesweiten Ringversuch „Schimmelpilze“ des Landesgesundheitsamtes Baden Württemberg. Darüber hinaus pflegt das NRZMyk enge Kontakte zu zahlreichen europäischen mykologischen Referenzzentren sowie zu einschlägigen Gremien der ESCMID und der ISHAM. Prof. Kurzai ist in seiner Funktion als deutscher Repräsentant des Subkomitees *Antifungal Susceptibility Testing* des EUCAST (Berufung 2015) und als Vertreter der DMykG im Nationalen Antibiotika-Sensitivitätstestkomitee (NAK) an der Standardisierung von mykologischen Testverfahren beteiligt. Das NRZMyk wurde zum EUCAST Netzwerklabor für die Testung von Hefen und Schimmelpilzen berufen.

Neben verschiedenen Vorträgen zu Klinik und Diagnostik von Pilzinfektionen hat das NRZMyk im September 2015 erstmalig einen Mikroskopiekurs zu den Gattungen *Aspergillus* und *Fusarium* durchgeführt. Im Fokus des vierstündigen Kurses standen neben häufigen vor allem seltene und wenig bekannte Arten und deren morphologische Charakteristika.

Um die epidemiologische Situation bei den invasiven Mykosen in Deutschland besser einschätzen zu können, kooperiert das NRZMyk mit FungiScope, einem weltweiten Register für seltene Pilzinfektionen (Leitung: Prof. O. Cornely, Infektiologie, Uniklinik Köln) und AlertsNet 2.0, einem thüringenweiten prospektiven populationsbasierten Register zur Erfassung von nosokomialen Blutstrominfektionen (Leitung: Prof. F. Brunkhorst, UKJ). Zudem hat das NRZMyk in Kooperation mit der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Düsseldorf ein nationales Register für mykotische Keratitiden initiiert.

Summary

After the establishment in 2014 the National Reference Center for Invasive Fungal Infections (NRZMyk) has developed into a central contact point for diagnostics and management of invasive fungal infections. This was accompanied by extension of the partner network to 70 diagnostic institutions in 2015. The number of processed samples has increased by >300% from 78 in the previous year to 239 in 2015. All clinical isolates were identified using molecular reference methods. In most cases susceptibility testing was performed using EUCAST microdilution protocols. All identified strains are stored in the stock collection of the NRZMyk (*Jena Microbial Ressource Collection* - JMRC). Isolates from the collection have been provided on request to diagnostic institutions. Beside identification and testing of clinical isolates, molecular detection of fungal pathogens in tissue samples is a major part of the NRZMyk work. For this, a portfolio of species- or group-specific PCRs as well as universal fungal PCRs has been established.

In addition to offering reference diagnostic beyond routine methods the NRZMyk expanded its research projects for development and improvement of diagnostic and therapeutic tools considerably in 2015. In a DFG funded project the taxonomic structure of *Mucoraceae* is revisited (DFG WA 3518/1-1). Together with partners from Halle, Leipzig and Dresden the development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* in the environment is analysed in the BMBF funded project FINAR coordinated by the NRZMyk. Furthermore, the NRZMyk develops an online database FunResDB that will enable users to retrieve information on resistance mutations – initially in the CYP51A gene of *Aspergillus fumigatus*. Together with the University Hospital Heidelberg the chemical stability and the antifungal activity of caspofungin infusion solution were analyzed.

Due to its taxonomic expertise, the NRZMyk has again been selected as reference laboratory for the ring trial “indoor mould fungi” of the Health Authority Baden Wuerttemberg. Furthermore, the NRZMyk maintains close contacts to numerous European mycological reference centers as well as to relevant committees of the ESCMID and the ISHAM. Prof. Kurzai is in his role as German representative of the subcommittee *Antifungal Susceptibility Testing* of the EUCAST (appointed in 2015) and as representative of the DMycG in *the National Antibiotics Sensitivity Test Committee* (NAK) involved in standardizing mycological test procedures, the NRZMyk has been appointed as EUCAST AFST (antifungal susceptibility testing) network laboratory for yeasts and moulds.

Beside lectures on diverse topics related to invasive fungal infections, the NRZMyk organized a microscopy course about important pathogenic species of the genera *Aspergillus* and *Fusarium* for the first time in September 2015. The four-hour course focused on common but more importantly on rare and little known pathogenic species and their morphological characteristics.

With regard to epidemiology of invasive fungal infections in Germany the NRZMyk cooperates with FungiScope, a worldwide register for rare fungal infections (Head: Prof. O. Cornely, Infectiology, University Hospital Cologne) and AlertsNet 2.0, a Thuringian wide prospective population based register to record nosocomial blood stream infections (Head: Prof. F. Brunkhorst, UKJ). In cooperation with the Department of Ophthalmology of the University Hospital Duesseldorf the NRZMyk initiated a national register for mycotic keratitis.

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

Entwicklung und Verbesserung diagnostischer Verfahren

Das NRZMyk hat in 2015 seine Beteiligung an Forschungsprojekten zur Entwicklung und Verbesserung diagnostischer Verfahren und therapeutischer Möglichkeiten deutlich ausgebaut. Einige Projekte von zentraler Relevanz für die Forschungstätigkeit des NRZMyk werden im Folgenden kurz dargestellt:

Projekt: Polyphasische taxonomische Revision der *Mucoraceae*

Koordination: NRZMyk (G. Walther)

Partner: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (Utrecht, S. de Hoog)

Förderung: DFG (WA3581/1-1)

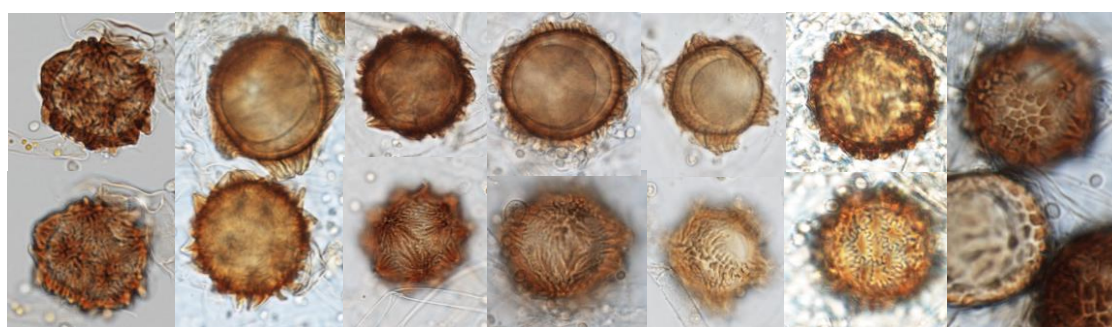


Abb. 1 – Analyse verschiedener Zygosporen von *Mucor*

Zusammenfassung

Infektionen durch Vertreter der *Mucorales* (Mucormykosen) haben in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen, was auf den Anstieg von Risikofaktoren wie Diabetes, Neutropenie oder der Langzeit-Einnahme von Steroiden infolge von Krebserkrankungen oder Transplantationen zurückgeführt wird. Nach Candidosen und Aspergillosen sind Mucormykosen heute die dritthäufigste invasive Pilzinfektion. Die Mehrheit der Fälle wird durch Arten der Gattungen *Rhizopus*, *Lichtheimia* und *Mucor* verursacht. Während für *Rhizopus* und *Lichtheimia* moderne Klassifikationen zur Verfügung stehen, fehlt eine molekulare Bearbeitung für die *Mucor*-Verwandtschaft. Für die meisten Erreger der Gattung *Mucor* fehlen definierte Artgrenzen, die die Voraussetzung für eine zuverlässige DNA-basierte Diagnostik bilden. Eine Diagnostik auf Artniveau ist gerade für die Gattung *Mucor* von Bedeutung, da sich die einzelnen Arten in ihrem Resistenzverhalten gegenüber Azolen unterscheiden. Ziel des Projektes ist es daher, mit Hilfe verschiedener Methoden (Multilocus-Sequenzanalyse, Morphologie, Kreuzungstests) eine moderne Klassifikation der *Mucor*-Verwandtschaft und darauf basierend Methoden zur molekularen Diagnostik auf Artebene zu erarbeiten. Diese Arbeiten sind eine entscheidende Voraussetzung für ein besseres Verständnis unterschiedlicher Virulenz oder Resistenz gegen Antimykotika bei den *Mucorales*. Für andere Gattungen werden *Barcoding*-Konzepte entwickelt (Yu et al., 2014).

Projekt: FINAR (*Fungal Infections and Emerging Azole Resistance*)**Koordination:** NRZMyk (O. Kurzai)**Partner:** Institut für Nutzpflanzenforschung (Halle, H. Deising)
Klinik für Vögel und Reptilien (Leipzig, E. Krautwald-Junghanns, V. Schmitt)
Biotype Diagnostic GmbH (Dresden, W. Brabetz)**Förderung:** BMBF (InfectControl 2020) 1.12.2015-30.11.2018*Zusammenfassung*

Schimmelpilze und insbesondere *A. fumigatus* verursachen nicht nur bei immunsupprimierten Patienten lebensbedrohliche Infektionen und hohe Kosten. Vergleichbare Probleme bestehen bei Vögeln, wo invasive Mykosen zu den häufigsten Erkrankungen zählen. Seit kurzem wird die Therapie dieser Infektionen durch Resistenzen gegen wichtige Antimykotika bei *Aspergillus fumigatus* (insbesondere Azole) erschwert. Mögliche Ursache ist der weit verbreitete Einsatz ähnlicher Substanzen im Pflanzenschutz. Entsprechende Resistenzentwicklungen bei phytopathogenen Pilzen sind seit langem bekannt. In FINAR erfassen Phytopathologen, Veterinärmediziner und Infektionsbiologen dazu erstmals systematisch die Resistenzselektion für *A. fumigatus*, analysieren die klinische Relevanz und entwickeln strategische Konzepte zur Verhinderung der Ausbreitung von Resistenzen. Auf dieser Datenbasis wird zudem in einer Kooperation mit der Biotype Diagnostic GmbH ein neues PCR-basiertes Testsystem für die Routinediagnostik der wichtigsten Erreger invasiver Mykosen entwickelt, das es erlaubt, Schimmelpilzinfektionen schnell zu erkennen und klinisch relevante Resistenzen zu detektieren.

Projekt: Stabilität von Caspofungin Infusionslösungen**Koordination:** Apotheke, Universitätsklinikum Heidelberg (Nadine Pinder)**Partner:** NRZMyk**Förderung:** keine*Zusammenfassung*

Die zentrale Zubereitung von Caspofungin Infusionslösungen erlaubt eine ökonomische Verwendung dieses Antimykotikums. Im Rahmen dieses Projekts wurden die chemische Stabilität und die Erhaltung der antifungalen Aktivität von Infusionslösungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Caspofungin (0.5 mg/ml) bei voller Wirksamkeit für 4 Wochen bei 2-8 °C und für 120 h bei 24 °C gelagert werden kann. (Pinder *et al.*, eingereicht)

Projekt: Datenbank zu Resistenzmutationen bei pathogenen Pilzen**Koordination:** NRZMyk**Förderung:** keine

Antimykotika-Resistenzen v.a. bei *Aspergillus fumigatus*-Stämmen gewinnen mehr und mehr an Bedeutung. Häufig werden Resistenzmutationen durch Sequenzierung des Gens CYP51A nachgewiesen. Aus diesem Grund entwickelt das NRZMyk eine Online-Datenbank FunResDB, die ab Mitte 2016 Ärzten und Mikrobiologen zur Verfügung stehen soll. Die Datenbank wird über die

Homepage des NRZMyk (www.nrz-myk.de) für die Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden. Sie umfasst derzeit alle bisher publizierten Mutationen des P450-Sterol-14-Demethylase-Gens (CYP51A) von *Aspergillus fumigatus* und den damit verbundenen Resistenzphänotyp für klinisch relevante Azole. Durch Eingabe der cyp51A-Sequenz des zu untersuchenden Stammes in die Datenbank erhalten Anwender Angaben zu Mutationen und deren in der Literatur beschriebenen Auswirkungen auf das Resistenzverhalten der Stämme. In den kommenden Jahren soll die Datenbank sukzessive um weitere Arten und Zielgene erweitert werden.

Standardisierung / Verbreitung allgemeingültiger Testverfahren, Qualitätssicherung

Seit 2014 fungiert das NRZMyk als Referenzlabor für den bundesweiten Ringversuch „Schimmelpilze“ des Landesgesundheitsamtes (LGA) 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. Zusammen mit der DSMZ bewertet das NRZMyk neben der charakteristischen Morphologie auch die Eignung von Stämmen für die Ringversuche auf der Basis von Sequenzdaten. Außerdem beteiligte sich das NRZMyk 2015 an der Fortbildungsveranstaltung des LGA zum Ringversuch mit einem Vortrag zum Thema ‚Neuere Entwicklungen in der Taxonomie der Zygomyceten‘ (6. März 2015). Das NRZMyk hat zudem 2015 an den INSTAND Ringversuchen Hefen/Schimmelpilze erfolgreich teilgenommen. 2015 wurde Prof. O. Kurzai als deutscher Repräsentant in das Subkomitee *Antifungal Susceptibility Testing* des *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) berufen und hat in dieser Funktion an der letzten Neufassung der EUCAST breakpoint Tabelle mitgewirkt. Er vertritt die Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft (DMyG) im Nationalen Antibiotika-Sensitivitätstestkomitee (NAK) und wurde ins Lenkungsgremium des NAK gewählt. Das NRZMyk wurde 2015 zum EUCAST Netzwerklabor für die Testung von Hefen und Schimmelpilzen berufen.

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

Das NRZMyk hat sich gemäß seiner Zielsetzung nach der Etablierung in Jena 2014 im Jahr 2015 zu einem zentralen Ansprechpartner in allen Fragen zu Diagnostik und Management invasiver Pilzinfektionen entwickelt. Maßgeblich dafür waren unter anderem eine vermehrte Öffentlichkeitsarbeit und insbesondere die Implementierung einer Internetseite (www.nrzmyk.de) mit allen Informationen zur Probeneinsendung an das NRZMyk. 2015 wurden im NRZMyk insgesamt 239 Proben bearbeitet. Das entspricht einem Anstieg der Probenzahl von mehr als 300% im Vergleich zum Vorjahr (2014: N=79). Für 2016 wird ein weiterer Anstieg erwartet. Unter den eingesandten Proben waren 49 klinische Materialien und 190 Vitalstämme. Die Stämme wurden molekular bestimmt und in der Mehrheit der Fälle (174 von 190 Stämmen) einer Resistenztestung mittels Mikrodilution nach EUCAST-Protokoll unterzogen. Die Leistungsdaten sind im Detail in Tabelle 1 aufgeführt. Charakteristisch für die Arbeit des NRZMyk ist das große Spektrum nachgewiesener und identifizierter Erreger. Dies wird der klinischen Herausforderung gerecht, bei unspezifischem Verdacht auf eine Pilzinfektion unabhängig von der Gattungszugehörigkeit einen Erregernachweis auf Speziesebene erzielen zu können.

Tab. 1: Leistungsdaten des NRZMyk für das Jahr 2015

Anzahl der bearbeiteten Proben insgesamt	239
a) Anzahl der klinischen Proben	49
davon:	
Gewebeproben - nativ	17
Gewebeproben - Paraffin-Präparate	13
BAL	4
Liquor	7
Punktate	5
DNA-Extrakte	3
b) Anzahl der identifizierten Vitalstämme	190
<i>Alternaria</i> sp.	2
<i>Arthrographis kalrae</i>	1
<i>Aspergillus flavus</i>	3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	35
<i>Aspergillus nidulans</i>	2
<i>Aspergillus niger</i>	1
<i>Aspergillus terreus</i> s.str.	2
<i>Aspergillus tubingensis</i>	4
<i>Aspergillus udagawae</i>	1
<i>Aspergillus uvarum</i>	1
<i>Aspergillus</i> cf. <i>westerdijkiae</i>	1
<i>Blastobotrys raffinifermentans</i>	3
<i>Candida albicans</i>	26
<i>Candida auris</i>	1
<i>Candida</i> aff. <i>blankii</i>	1
<i>Candida dubliniensis</i>	9
<i>Candida glabrata</i>	20
<i>Candida guilliermondii</i>	1
<i>Candida krusei</i>	6
<i>Candida lusitaniae</i>	1
<i>Candida parapsilosis</i>	5
<i>Candida tropicalis</i>	4
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	1
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	1
<i>Exophiala dermatitidis</i>	2
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	1
<i>Fusarium falciforme</i>	1
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	3
<i>Fusarium musae</i>	2
<i>Fusarium oxysporum</i> Komplex	5
<i>Fusarium petroliphilum</i>	4
<i>Fusarium proliferatum</i>	3
<i>Fusarium sacchari</i>	1
<i>Fusarium solani</i> Komplex (FSSC5)	3
<i>Geotrichum candidum</i>	1
<i>Lecytophora hoffmannii</i>	1
<i>Lecytophora</i> sp. (<i>Coniochaeta</i> sp.)	1
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	1
<i>Microascus</i> cf. <i>cirrosus</i>	1
<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i>	3
Onygenaceae sp.	1
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1

<i>Penicillium</i> sp.	1
<i>Peniophora</i> sp.	1
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	4
<i>Rhizomucor pusillus</i>	1
<i>Rhizopus arrhizus</i>	1
<i>Rhizopus microsporus</i>	3
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Saprochaete clavata</i>	1
<i>Scedosporium apiospermum</i>	3
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1
<i>Trametes</i> sp.	1
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	1
<i>Trichosporon asahii</i>	1
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	2
Anzahl der Proben mit Antimykogramm	174

Anzahl der molekularen Resistenztestungen/Anzahl der nachgewiesenen Mutationen:	
<i>Aspergillus fumigatus</i> , P450-Sterol-14-Demethylase-Gen (<i>cyp51A</i>)	6/3
<i>Pneumocystis jirovecii</i> , Dihydropteroat-Synthase (DHPS) und Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)	1/0
<i>Candida albicans</i> , 1,3-Beta-D-Glucan-Synthase (FKS1)	10/8
<i>Candida dubliniensis</i> , 1,3-Beta-D-Glucan-Synthase (FKS1)	9/1
<i>Candida glabrata</i> , 1,3-Beta-D-Glucan-Synthase (FKS1 und FKS2)	11/8
<i>Candida krusei</i> , 1,3-Beta-D-Glucan-Synthase (FKS1)	6/1
Anzahl der durchgeführten Subtypisierungen/davon Ausbruchsverdacht	4/2

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. 2). Die Bestimmung der Spezies erfolgt auf Basis von internen Alignments, die nur sicher charakterisierte Isolate umfassen.

Tab. 2: Ausgewählte Markergene für die Speziesbestimmung von klinischen Isolaten.

Alignment	Marker
<i>Acremonium</i> sensu lato	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>Blastobotrys</i>	ITS , LSU
<i>Candida</i>	ITS
<i>Cryptococcus</i>	ITS
<i>Exophiala</i>	ITS

Alignment	Marker
<i>Acremonium sensu lato</i>	ITS und 28S D1/D2 Domäne (LSU)
<i>Fusarium fujikuroj</i> Artkomplex	Translationselongationsfaktor 1alpha (TEF)
<i>Fusarium oxysporum</i> Artkomplex	Translationselongationsfaktor 1alpha (TEF)
<i>Fusarium solani</i> Artkomplex	Translationselongationsfaktor 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)

Zur Feintypisierung von Erregern bei Ausbruchsfragestellungen kommen am NRZMyk verschiedene PCR- und Sequenz-basierte Methoden zum Einsatz. Dazu gehören Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) und Mikrosatelliten-PCR und Multilokus-Sequenztypisierung (MLST). Im Jahr 2015 wurden im NRZMyk keine Fälle von Ausbruchsgeschehen nachgewiesen.

Insgesamt wurden vier Subtypisierungen durchgeführt. In zwei Fällen bestand der Verdacht auf eine Ausbruchssituation. Die Ergebnisse der Subtypisierungen konnten den Verdacht widerlegen. Weitere zwei Subtypisierungen für *Candida albicans* wurden aufgrund des Verdachts auf Resistenzentwicklung im Patienten vorgenommen. Die Multilokus-Sequenztypisierung von sieben Markergenen unterstützte in beiden Fällen diesen Verdacht.

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. Derzeit umfasst die Sammlung bereits 260 klinische Stämme, die über das NRZMyk aufgenommen wurden. Auf Anfrage werden diese Stämme für diagnostische und wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung gestellt. Alle in dieser Kollektion enthaltenen Stämme sind molekular identifiziert und für die Mehrheit der Stämme liegen Resistenzprofile für alle wichtigen Antimykotika vor, was die Stammauswahl zu Forschungszwecken wesentlich erleichtert. So konnte das NRZMyk 2015 dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg (IMHR) fünf Azol-resistente *Aspergillus fumigatus*-Stämme für die Forschung zur Verfügung stellen, dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Köln wurden *Fusarium*-Isolate aus invasiven Infektionen zur Verfügung gestellt.

4. Aufbau und koordinierende Pflege eines Netzwerks diagnostischer Einrichtungen.

Dem NRZMyk ist es gelungen seit 2014 ein umfassendes nationales Netzwerk aus diagnostischen Einrichtungen, insbesondere Mikrobiologischen Instituten und Instituten für Labormedizin an Universitätskliniken, zu etablieren. In den meisten Einrichtungen stehen dem NRZMyk

Ansprechpartner für klinisch-mykologische Untersuchungen zur Verfügung. Insgesamt erhielt das NRZMyk Proben aus insgesamt 70 einsendenden Einrichtungen aus 49 Städten (Abb. 2)



Abb. 2: Die im NRZMyk bearbeiteten Proben stammen aus Einrichtungen des gesamten Bundesgebiets.

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

Neben der Bearbeitung eingesendeter Proben steht das NRZMyk auch als Ansprechpartner für Ärzte und Mikrobiologen bei Fragen zur Diagnostik, Therapie und zum klinischen Management opportunistischer invasiver Pilzinfektionen zur Verfügung. Im Jahr 2015 wurden insgesamt ca. 250 Beratungsleistungen vorwiegend telefonisch oder selten per E-Mail durchgeführt (etwa 5/Woche). Das NRZMyk informiert auf seiner Homepage www.nrz-myk.de über den Leistungskatalog und das

Prozedere zur Einsendung von Probenmaterial (inkl. herunterladbares Einsendeformular), über angebotene Weiterbildungsveranstaltungen sowie über Erreger invasiver Pilzinfektionen. Darüber hinaus werden per Newsletter aktuelle Informationen aus dem Gebiet der Mykologie verbreitet.

Vorträge auf Fachveranstaltungen

Auch im Jahr 2015 war das NRZMyk an zahlreichen Fach- und Fortbildungsveranstaltungen zum Thema invasive Pilzinfektionen beteiligt. Die wesentlichen Vorträge sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Vorname	Name	Titel des Vortrages	Anlass (Tagung etc.)	Ort	Datum
Oliver	Kurzai	Ziele und Aufgaben des NRZMyk	Münchener Infektionsmed. Kolloquien	München	17.01.2015
Grit	Walther	Zygomycota (Mucoromycotina)	CBS Fungal Biodiversity Course	Utrecht	10.02.2015
Grit	Walther	Neuere Entwicklungen in der Taxonomie der Zygomyceten	Fortbildungsveranstaltung des LGA Baden Württemberg zum Ringversuch	Stuttgart	06.03.2015
Oliver	Kurzai	Diagnostik von Pilzinfektionen	Pfizer Fortbildungsveranstaltung am Institut für medizinische Mikrobiologie, UKJ	Jena	11.03.2015
Oliver	Kurzai	Herausforderung in der Diagnostik Invasiver Pilzinfektionen	Frühjahrstagung Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie e.V.	Bad Staffelstein	17.04.2015
Grit Marie	Walther von Lilienfeld-Toal	Gefährliche Kontaktlinsen	Infektiologische Fallkonferenz, UKJ	Jena	27.05.2015
Oliver	Kurzai	The role of neutrophils in invasive fungal infections	Medical Immunology Campus, Immunologisches Kolloquium	Erlangen	23.06.2015
Oliver	Kurzai	Diagnostik Invasiver Mykosen auf der Intensivstation	49. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. und 1. International Symposium of the CRC/Transregio FungiNet	Jena	16.09.2015
Oliver	Kurzai	Resistenzproblematik bei Pilzen	49. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. und 1. International Symposium of the CRC/Transregio FungiNet	Jena	17.09.2015
Lysett	Wagner	A new species concept of the human pathogenic <i>Mucor circinelloides</i> complex	49. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. und 1. International Symposium of the CRC/Transregio FungiNet	Jena	17.09.2015
Oliver	Kurzai	Neue Perspektiven der Entwicklung und Nutzung von Impfstoffen – InfectControl 2020	67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e. V.	Münster	30.09.2015
Oliver	Kurzai	Speziesdiagnostik & Resistenztestung am NRZMyk	67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e. V.	Münster	30.09.2015

Mikroskopiekurs

Das NRZMyk hat im Jahr 2015 erstmals einen Mikroskopiekurs ausgerichtet. Dieser fand im Rahmen der 49. Wissenschaftlichen Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft DMykG in Jena statt. In einem vierstündigen Kurs (Teilnehmerzahl: 23) wurden wichtige pathogene Vertreter der Gattungen *Aspergillus* und *Fusarium* behandelt. In beiden artenreichen Gattungen wurden in den letzten Jahren im Zuge ihrer molekular-taxonomischen Bearbeitung neue pathogene Arten beschrieben und andere Arten als klinisch relevant erkannt. Viele dieser für die Diagnostik neuen Arten sind von den bekannten Arten morphologisch nur schwer oder gar nicht zu unterscheiden. Ziel des Mikroskopiekurses war es daher, sowohl häufige Erreger-Arten als auch seltene und wenig bekannte pathogene Vertreter und deren Charakteristika vorzustellen und darüber hinaus auf die Grenzen der Morphologie und die Möglichkeiten der molekularen Identifizierung hinzuweisen. Das NRZMyk erstellte für den Mikroskopiekurs ein Handbuch mit

Beschreibungen aller behandelten Arten anhand eigens für das Handbuch hergestellten und fotografierten Präparaten und Bestimmungsschlüsseln, die die oft abweichende Morphologie klinischer Isolate berücksichtigen. Unter Anwendung der im Handbuch bereitgestellten Bestimmungsschlüssel sind die Kursteilnehmer nunmehr in der Lage, die Mehrheit der seltenen *Aspergillus*-Arten mit abweichenden Resistenzverhalten und die Artkomplexe der Gattung *Fusarium* bereits morphologisch zu identifizieren. Basierend auf der Auswertung der Evaluierungsbögen wurde der Kurs von den Teilnehmern insgesamt als sehr gut bewertet. Das Niveau entsprach durchweg den Vorkenntnissen der Teilnehmer, die Kursinhalte wurden als aktuell und von großer sowohl klinischer und als auch praktischer Relevanz eingeschätzt, so dass fast alle Teilnehmer signalisierten, an zukünftigen Mikroskopiekursen des NRZMyk teilzunehmen. Über die Evaluierungsbögen wurden ebenso Themenvorschläge für kommende Veranstaltungen gesammelt. Das Kurshandbuch wurde ausnahmslos als sehr gut bewertet.

GESTIS Biostoffdatenbank

Die GESTIS-Biostoffdatenbank enthält Informationen für sichere Tätigkeiten mit Biostoffen am Arbeitsplatz, wie z. B. die erforderlichen technischen, organisatorischen und persönlichen Schutzmaßnahmen bei „gezielten“ Tätigkeiten in Laboratorien, in der Biotechnologie und der Versuchstierhaltung. Darüber hinaus wird über wichtige Eigenschaften der einzelnen Biostoffe informiert, z. B. Vorkommen und krankheitserregende Eigenschaften. Informationen zu Tätigkeiten in anderen Branchen, bei denen möglicherweise Biostoffe auftreten (meistens sogenannte „nicht gezielte“ Tätigkeiten, z. B. Abfall- oder Abwasserwirtschaft), können besonderen Tätigkeitsdatenblättern entnommen werden. Die GESTIS-Biostoffdatenbank ist ein Gemeinschaftsprojekt der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV), der Berufsgenossenschaft Rohstoffe und chemische Industrie (BG RCI) und des Bundesministeriums für Arbeit und Soziales (BMAS) und wird erstellt und gepflegt vom Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA). Biostoffdatenblätter werden im Auftrag der BG RCI von ausgewiesenen Fachleuten erstellt (Quelle: <http://www.dguv.de/ifa/GESTIS/GESTIS-Biostoffdatenbank/index.jsp>). Das NRZMyk fungiert als Experte für die Bewertung von Pilzen im Rahmen dieser Datenbank (Prof. O. Kurzai).

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. Das NRZMyk steht hier vor allem im engen Austausch mit folgenden internationalen Partnern:

Land	Einrichtung	Ansprechpartner
Niederlande	Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht	Sybren de Hoog
Spanien	Spanish National Center for Microbiology, Madrid	Ana Alastruey-Izquierdo
Österreich	Referenzzentrale für <i>Aspergillus</i> und <i>Aspergillus</i> -Infektionen, Medizinische Univ. Innsbruck	Cornelia Lass-Flörl
Österreich	Referenzzentrale für <i>Candida</i> und <i>Candida</i> -Infektionen, AKH Wien	Birgit Willinger

Frankreich	<i>National Reference Centre for Mycoses & Antifungals</i> , Université Paris Descartes and Institut Pasteur, Paris, France	Olivier Lortholary
Großbritannien	<i>Mycology Reference Center</i> , Manchester	Malcolm Richardson
Dänemark	Nationales Referenzzentrum für Pilzinfektionen, Statens Serum Institute, Kopenhagen	Maiken Arendrup

Neben den direkten bilateralen Kontakten erfolgt der Austausch auch über die einschlägigen Gremien der *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) und der *International Society for Human and Animal Mycology* (ISHAM).

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 Erfassung der Epidemiologie von invasiven Pilzinfektionen ist eine zentrale Herausforderung für das NRZMyk. Für die zweite Förderphase ist hierzu in Kooperation mit dem RKI die Etablierung eines Sentinelnetzwerks geplant, das aus der Gruppe der mit dem NRZMyk kooperierenden Labors hervorgehen soll. Folgende Aktivitäten zur Epidemiologie von Pilzinfektionen fanden bereits 2015 statt:

Kooperation mit FungiScope

In 2015 wurde eine Kooperation des NRZMyk mit FungiScope, einem weltweiten Register für seltene Pilzinfektionen, das von der Infektiologie der Uniklinik Köln (Oliver Cornely) geleitet wird, initiiert. Im Rahmen dieser Kooperation werden Einsender des NRZMyk gebeten, klinische Daten zu seltenen am NRZMyk diagnostizierten Mykosen im Rahmen des Infektionsregisters FungiScope zu erfassen. FungiScope stellt dazu Dokumentationshilfe zur Verfügung. Diese Daten können zukünftig als Basis für die Entwicklung neuer diagnostischer Methoden und die Verbesserung der Therapieberatung auf nationaler und internationaler Ebene dienen. Gleichzeitig werden alle aus Deutschland für die Stammsammlung von FungiScope eingereichten Isolate zur Referenzidentifizierung an das NRZMyk weitergeleitet und in der Stammsammlung des NRZMyk asserviert.

Etablierung eines Registers für Mykotische Keratitiden

siehe unter 8.

Kooperation mit AlertsNet 2.0 (www.alertsnet.de)

AlertsNet ist ein thüringenweites prospektives populationsbasiertes Register zur Erfassung von nosokomialen Blutstrominfektionen und Antibiotikaresistenzen sowie zur Verbesserung einer leitliniengerechten Blutkulturdiagnostik, das im Rahmen des Integrierten Forschungs- und Behandlungszentrums *Center for Sepsis Control and Care* (CSCC) vom BMBF gefördert wird (Leitung: Prof. F. Brunkhorst). Im Rahmen von AlertsNet wird für Thüringen ein landesweites Surveillance-System zur Blutkulturdiagnostik etabliert. Das NRZMyk beteiligt sich als Partner an diesem Projekt. Ziel ist eine populationsbezogene Erfassung von Candidämien in Thüringen. Im

Zeitraum 01.05.2014-30.04.2015 wurden bei etwa 29.000 erfassten Blutkultur-Sets 59 Fungämien mit *Candida albicans* und 68 für *Candida non-albicans*-Spezies (Summe 127) bei insgesamt 60 Patienten nachgewiesen. Nach abschließender Etablierung des Netzwerks wird eine populationsbezogene Erfassung der Epidemiologie von Candidämien in Thüringen möglich sein. Gleichzeitig erfolgt eine Sammlung aller Blutkulturisolate, so dass auch weitergehende epidemiologische Analysen sowie Untersuchungen zur Resistenzentwicklung möglich sind.

Retrospektive epidemiologische Analyse von *C. albicans*-Blutstromisolaten

In einem Kooperationsprojekt mit dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg und dem Pasteur-Institut Paris wurde am NRZMyk die genetische Variabilität von 95 Blutstrom-Isolaten von *Candida albicans* untersucht. Mittels Multilokus-Sequenzierung wurde eine große genetische Heterogenität der Isolate nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2015 im *International Journal of Medical Microbiology* veröffentlicht (siehe Anhang/Publikationsverzeichnis).

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.

Am NRZMyk erfolgt im Rahmen von wöchentlichen Besprechungen regelmäßig eine Überwachung der Einsendedata. 2015 wurde hierbei ein Handlungsbedarf bei mykotischen Keratitiden identifiziert, der zur Etablierung eines nationalen Registers geführt hat.

Mykotische Keratitis

Die mykotische Keratitis ist ein verhältnismäßig seltenes, aber sehr ernst zu nehmendes ophthalmologisches Krankheitsbild mit potenziell Visus-bedrohendem Verlauf. Die Therapie gestaltet sich oft langwierig und schwierig, in nicht wenigen Fällen ist eine operative Therapie mit Keratoplastik notwendig. Möglicherweise bedingt durch die vermehrte Verwendung weicher Kontaktlinsen ist in den letzten Jahren eine Häufigkeitszunahme dieser Erkrankung festzustellen. Seit seinem Bestehen in Jena registrierte das NRZMyk 20 Fälle von Augeninfektionen bei Kontaktlinsenträgern ohne Grunderkrankung durch *Fusarium*-Arten. Erreger der Gattung *Fusarium* sind schwer zu behandeln, da sie intrinsisch hohe MHK (Minimale Hemmkonzentration)-Werte gegenüber den meisten Antimykotika aufweisen (Tab. 4). Mit einem Vortrag auf der Infektiologischen Fallkonferenz des Universitätsklinikums Jena (27. Mai 2015) stellte das NRZMyk verschiedene Fälle von Augeninfektionen durch die Gattung *Fusarium* vor.

Tab. 4: Identifizierung und MHK-Werte der *Fusarium*-Spezies (Auge)

Stamm-Nr.	Artkomplex	Nata	AMB	Itra	Vori	Caspo	Herkunft
NRZ-2015-161	FFSC	8	2	>8	4	>32	Auge
NRZ-2014-13	FSSC		1	>8	>8	>8	Auge
NRZ-2014-22	FSSC		2	>8	8	>8	Auge
NRZ-2014-36	FOSC		1	>8	4	>8	Auge
NRZ-2014-69	FSSC		2	>8	8	>8	Auge
NRZ-2014-79	FSSC		2	>8	4	>8	Auge
NRZ-2015-02	FSSC		1	>8	1	>8	Auge
NRZ-2015-35	FSSC		1	>8	>8	>8	Auge
NRZ-2015-63	FSSC		0.5	>8	>8	>8	Auge
NRZ-2015-87	FSSC		4	>8	8	>8	Auge
NRZ-2015-96	FSSC		2	>8	>8	>8	Auge
NRZ-2015-123	FSSC	4	2	>8	>8	>32	Auge
NRZ-2015-124	FSSC	4	8*	>8	>8	>32	Auge
NRZ-2015-152	FOSC	4	2	>8	4	>32	Auge
NRZ-2015-163	FOSC		1	>8	4	>32	Auge
NRZ-2015-164	FOSC		1	>8	4	>32	Auge
NRZ-2015-170	FFSC	8	1	>8	8	>32	Auge
NRZ-2015-173	FOSC	4	2	>8	4	>32	Auge
NRZ-2015-174	FSSC	>8	2	>8	>8	>32	Auge
NRZ-2015-239	FOSC	4	0.5	>8	4	>32	Auge

FSSC (*Fusarium solani* species complex), FFSC (*Fusarium fujikuroi* species complex), FOSC (*Fusarium oxysporum* species complex)

Für eine bessere Bewertung der Risikofaktoren und Optimierung der Behandlungsstrategien führt das NRZMyk eine detaillierte Dokumentation der Augeninfektionen durch *Fusarium*-Arten durch. Zudem wurde in Kooperation mit der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Düsseldorf (Prof. G. Geerling, Dr. M. Roth) ein nationales Register für Mykotische Keratitiden initiiert. Die Sektion Kornea der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft stimmt der Initiierung des Registers zu, alle eingebundenen Kliniken werden das Register bei der Erhebung der mikrobiologischen und klinischen Daten unterstützen. Die notwendigen Abläufe wurden festgelegt. Im Falle einer mikrobiologisch diagnostizierten Pilzkeratitis ergeht nach Einsendung der positiven Probe im NRZMyk (hier: mikrobiologische Aufarbeitung inkl. Speziesidentifizierung, ggf. Subtypisierung, Resistenztestung, Asservierung in der Stammsammlung etc.) anonym Meldung an das Pilzkeratitis-Register zur Erhebung der klinischen Daten - soweit möglich inkl. Fotodokumentation. Den kooperierenden Kliniken werden hierfür entsprechende Erhebungsbögen sowohl in Papier- wie auch in digitaler Form zur Verfügung gestellt.

9. Epidemiologische Analyse und Bewertung der Resistenz- und Virulenzentwicklung

Das NRZMyk führt für die Mehrheit der eingehenden Isolate phänotypische Resistenztestungen mit der Mikrodilutionsmethode nach den Vorgaben des EUCAST durch. *Aspergillus fumigatus*-Isolate, die im Mikrodilution-Test deutlich erhöhte MHK-Werte aufweisen, werden auf das Vorhandensein von Mutationen im Zielgen der Azole, dem P450-Sterol-14-Demethylase-Gen (*cyp51A*) untersucht. Bei *Candida*-Stämmen (*Candida glabrata*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*) mit phänotypisch nachgewiesener Echinocandin-Resistenz werden die Hotspot-Regionen des Gens bzw. der Gene für die 1,3-Beta-D-Glucan-Synthase (*FKS1* und *FKS2*) sequenziert. Alle bisher in die molekulare Resistenztestung einbezogenen Zielgene mit den dazugehörigen Primern der jeweiligen Art sind in Tabelle 5 aufgeführt. Tabelle 6 fasst die 2015 bei den einzelnen Arten nachgewiesenen Mutationen zusammen. 2015 war das NRZMyk erstmals an der Erstellung des GERMAP Atlas beteiligt und verantwortet für die Neuauflage die Abschnitte zu Resistenzen bei Hefen und Schimmelpilzen.

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/CAS2r_497
<i>Candida dubliniensis</i>	1,3-Beta-D-Glucan-Synthase 1 (<i>FKS1</i>), Hotspot 1	CD1f_450/ CD1r_450 (unpubl.)
<i>Candida dubliniensis</i>	1,3-Beta-D-Glucan-Synthase 1 (<i>FKS1</i>), Hotspot 2	CDS2f_497/CDS2r_497 (unpubl.)
<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>Candida krusei</i>	1,3-Beta-D-Glucan-Synthase 1 (<i>FKS1</i>), Hotspot 1	CKS1f/CKS1r
<i>Candida krusei</i>	1,3-Beta-D-Glucan-Synthase 1 (<i>FKS1</i>), Hotspot 2	CKS1f/CKS1r
<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 Zielgenen bei vorliegenden Antimykotikumresistenzen bei Isolaten der Spezies *Aspergillus fumigatus*, *Candida glabrata*, *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. krusei*.

Species	Zielgen	Mutationen (Häufigkeit)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>CYP51A</i>	L98H (1), G54E (1), M220I (1)
<i>Candida albicans</i>	<i>FKS1</i>	F641S (1), S645P (5), R1361H (1)
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>FKS1</i>	R1361S (1)
<i>Candida glabrata</i>	<i>FKS1</i> und <i>FKS2</i>	F659S (3), S629P (1), F659del (1), S663P (2)
<i>Candida krusei</i>	<i>FKS1</i>	S659F (1)

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. In 2015 fand keine Beratung des RKI statt. Ein Artikel zu mykotischen Keratitiden wurde für das Epidemiologische Bulletin verfasst (z. Zt. in Begutachtung).

Anhang

Publikationsverzeichnis

Veröffentlichte Publikationen mit direktem Bezug zum NRZMyk

Huyke J, Martin R, Walther G, Weber M, Kaerger K, Bougnoux ME, Elias J, Kurzai O (2015) *Candida albicans* bloodstream isolates in a German university hospital are genetically heterogenous and susceptible to commonly used antifungals. *Int J Med Microbiol* 305(7), 742-747.

Yu J, Walther G, Van Diepeningen AD, Gerrits Van Den Ende AH, Li RY, Moussa TA, Almaghrabi OA, De Hoog GS. (2015) DNA barcoding of clinically relevant *Cunninghamella* species. *Med Mycol.* 53(2):99-106.

2014 - 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* 10(12):e1004824.

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.

Ekaney ML, Otto GP, Sossdorf M, Sponholz C, Boehringer M, Loesche W, Rittirsch D, Wilharm A, Kurzai O, Bauer M, Claus RA. (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, van der Voort R, Jacobsen ID, Verschueren I, Hube B, Giamarellos-Bourboulis EJ, van der 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.

Hünniger 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. 201;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. 370(5):421-32.

Voigt J, Hünniger 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 Infect Dis. 209(4):616-26.

2015 - weitere Publikationen der Arbeitsgruppe

Beitzen-Heineke A, Bouzani M, Schmitt AL, Kurzai O, Hünniger K, Einsele H, Loeffler J (2015) Human Invariant Natural Killer T cells possess immune-modulating functions during *Aspergillus* infection. Med Mycol 54(2):169-76.

Fliesser M, Morton CO, Bonin M, Ebel F, Hünniger K, Kurzai O, Einsele H, Löffler J (2015) Hypoxiainducible factor 1 α modulates metabolic activity and cytokine release in anti-*Aspergillus fumigatus* immune responses initiated by human dendritic cells. Int J Med Microbiol 305(8):865-73.

Essig F, Hünniger K, Dietrich S, Figge MT, Kurzai O (2015) Human neutrophils dump *Candida glabrata* after intracellular killing. Fungal Genetics and Biology 84, 37-40.

Lehnert T, Timme S, Pollmächer J, Hünniger K, Kurzai O, Figge MT (2015) Bottom-up modeling approach for the quantitative estimation of parameters in pathogen-host interactions. Frontiers in Microbiology 6:608.

Duggan S, Essig F, Hünniger K, Mokhtari Z, Bauer L, Lehnert T, Brandes S, Häder A, Jacobsen ID, Martin R, Figge MT, Kurzai O (2015) Neutrophil activation by *Candida glabrata* but not *Candida albicans* promotes fungal uptake by monocytes. Cell Microbiol 17(9), 1259-1276.

Dix A, Hünniger K, Weber M, Guthke R, Kurzai O, Linde J (2015) Biomarker-based classification of bacterial and fungal whole-blood infections in a genome-wide expression study. Front Microbiol 6, 171.

Duggan S, Leonhardt I, Hünniger K, Kurzai O (2015) Host response to *Candida albicans* bloodstream infection and sepsis. Virulence 6(4):316-26

Leonhardt I, Spielberg S, Weber M, Albrecht-Eckardt D, Bläss M, Claus R, Barz D, Scherlach K, Hertweck C, Löffler J, Hünniger K, Kurzai O (2015) The fungal quorum-sensing molecule farnesol activates innate immune cells but suppresses cellular adaptive immunity. MBio 6(2):e00143

Brandes S, Mokhtari Z, Essig F, Hünniger K, Kurzai O, Figge MT (2015) Automated segmentation and tracking of non-rigid objects in time-lapse microscopy videos of polymorphonuclear neutrophils. Medical Image Analysis 20(1), 34-51.

Linde J, Duggan S, Weber M, Horn F, Sieber P, Hellwig D, Riege K, Marz M, Martin R, Guthke R, Kurzai O (2015) Defining the transcriptomic landscape of *Candida glabrata* by RNA-Seq Nucleic Acids Res 43(3):1392-406.

Hünniger K, Bieber K, Martin R, Lehnert T, Figge MT, Löffler J, Guo R, Riedemann N, Kurzai O (2015) A second stimulus required for enhanced antifungal activity of human neutrophils in blood is provided by anaphylatoxin C5a. Journal of Immunology 194(3), 1199-1210.

Mitarbeiterverzeichnis

Name	Funktion	Telefon 03641-532...	E-Mail
Prof. Dr. med. Oliver Kurzai	Leiter	1551	oliver.kurzai@leibniz-hki.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 Klinik	1720	marie.von_lilienfeld-toal@med.uni-jena.de
Dr. rer. nat. Kerstin Kaerger	PostDoc	1574	kerstin.kaerger@leibniz-hki.de
Dr. rer. nat. Grit Walther	PostDoc	1038	grit.walther@leibniz-hki.de
Alexandra Köhler (seit 17.12.15 Mutterschutz)	TA	1582	alexandra.koehler@leibniz-hki.de
Christiane Weigel	TA	1111	christiane.weigel@leibniz-hki.de
Carmen Karkowski	TA	1052	carmen.karkowski@leibniz-hki.de

Abkürzungsverzeichnis

AMB	Amphotericin B
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CASPO	Caspofungin
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CYP51A	14 α -sterol-Demethylase Gen
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DHPS	Dihydropteroat-Synthase
DMykG	Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft e.V.
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> - Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ESCMID	<i>European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
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
ISHAM	<i>International Society for Human and Animal Mycology</i>
ITRA	Itraconazol
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
JMRC	<i>Jena Microbial Resource Collection</i>
LSU	<i>large subunit</i>
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ribonukleinsäure
TEF	Translationselongationsfaktor 1alpha
UKJ	Universitätsklinikum Jena
VORI	Voriconazol