

17. Tagung der Arbeitsgemeinschaft „Mykologische Laboratoriumsdiagnostik“ der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMykG) am 4. November 2005 in Leipzig

P. Nenoff¹
Dagmar Rimek²
J. C. Simon³

17th Symposium of the Working Group „Mycological Laboratory Diagnostics“ of the German Speaking Mycological Society, November 4th, 2005, in Leipzig

Die 17. Tagung der Arbeitsgruppe „Mykologische Laboratoriumsdiagnostik“ der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft fand 2005 zum fünften Mal in Leipzig statt. Über 80 Teilnehmer – MTA, Mikrobiologen, Mitarbeiter von Landesuntersuchungsanstalten, Laborärzte und Dermatologen – sprachen für die Akzeptanz dieser primär als Weiterbildung auf dem Gebiet der mykologischen Labordiagnostik konzipierten Veranstaltung.

Am Freitag Vormittag standen praxisrelevante Vorträge rund um die Themen Dermatophyten sowie Mykotoxine im Mittelpunkt des Interesses.

Neben der „klassischen“ mikrobiologischen Differenzierung der Hautpilze kamen auch molekularbiologische Methoden zum Pilznachweis zur Sprache. Eine besonders interessante Alternative zur DNS-Analyse von Pilzen z. B. mit PCR (Polymerasekettenreaktion) und Sequenzierung bietet darüber hinaus die MALDI-TOF-Massenspektroskopie zur Identifizierung der Dermatophyten bis zur Speziesebene.

Erfreulicherweise waren in diesem Jahr auch die Veterinärmykologen wieder stärker im Programm verankert. So ging es um das nach wie vor aktuelle Thema der Katzen-Mikrosporidie, daneben um die Bestimmung und Bewertung von *Fusarium*-Mykotoxinen im Getreide.

Es war gelungen, Herrn Professor Hans-Jürgen Tietz vom Institut für Pilzkrankheiten in Berlin für den Mykologie-Kurs am Freitag Nachmittag zu gewinnen. Dieser praktische Kurs zur Differenzierung von häufigen und seltenen Dermatophyten-Arten, durchgeführt im Mikroskopiersaal des Instituts für Anatomie der Univer-

sität Leipzig, wurde von den Teilnehmern der Tagung mit großem Interesse aufgenommen. Neben bekannten Dermatophyten, wie *Trichophyton (T.) rubrum* und *Microsporum (M.) canis*, wurde großer Wert auf zwar selten vorkommende, jedoch aufgrund der epidemiologischen Situation wieder aktuelle Erreger gelegt. Zu letzteren zählen u. a. *M. audouinii*, *T. soudanense*, *T. violaceum* und der Verursacher des Favus, *T. schoenleinii*.

Morphologische und physiologische Differenzierungsmerkmale von Dermatophyten

Jochen Brasch

Hautklinik am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Eine Beurteilung des Nativpräparates ist notwendig, um nicht vitale Pilze zu erfassen und erste Hinweise auf die Erregerart zu gewinnen: gefärbte oder farblose Hyphen, endo- und ektotriche Sporen und besondere Zellformen sollten registriert werden.

Das Aussehen von Dermatophytenkulturen hängt stark von evtl. Vorschädigung (z. B. durch antimykotische Therapie), Nährsubstraten, sonstigen Kulturbedingungen und dem Alter der Kultur ab. Daher empfehlenswert: immer den gleichen Standardnährboden vom selben Hersteller für die Primärkultur verwenden und unter immer gleichen Bedingungen, am besten im Brutschrank, inkubieren. Von auffälligen Primärkulturen ggf. frühzeitig Subkulturen anlegen. Wachstum im zeitlichen Verlauf beobachten.

Institutsangaben

¹ Laboratorium für medizinische Mikrobiologie, Mölbis

² Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit & Verbraucherschutz, Erfurt

³ Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum, Leipzig

Korrespondenzadresse

Priv.-Doz. Dr. med. Pietro Nenoff · Laboratorium für medizinische Mikrobiologie · Straße des Friedens 8 · 04579 Mölbis · E-mail: info@mykologie-experten.de

Bibliografie

Akt Dermatol 2006; 32: 142–147 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
DOI 10.1055/s-2006-925067 · ISSN 0340-2541

Geeignete Nährböden für die Routine

Sabouraud-Agar: enthält Pepton und Glucose; international üblicher Standardnährboden.

Kimmig-Agar: enthält außerdem NaCl und Glycerin; stimuliert Konidien- und Pigmentbildung, reduziert jedoch die Wachstumsgeschwindigkeit, (jeweils mit Antibiotikazusatz (z. B. Chloramphenicol 50 mg/l, Penicillin/Streptomycin 40 000 IE/l; mit und ohne Cycloheximid 400 mg/l).

Morphologische Differenzierung

Eine morphologische Beurteilung der Kultur auf dem Routine-nährboden ist immer erforderlich. Wenn sich dabei keine distinkten Merkmale zeigen, sollte versucht werden, solche in Subkulturen auf Spezialnährböden zu stimulieren.

Makroskopisch: Wachstumsgeschwindigkeit, Oberflächenstruktur, Randbeschaffenheit, Pigmentierung an Ober- und Unterseite, Pigmentfreisetzung.

Mikroskopisch (Tesaabklatschpräparat oder Mikrokultur; Lactophenolblaufärbung): Hyphenformen, Hyphenverzweigung, Mikrokonidien, Makrokonidien, Chlamydosporen, Arthrokonidien, Knotenorgane.

Physiologische Differenzierung

Physiologische Tests sind hilfreich, wenn die Morphologie keine eindeutige Artbestimmung zulässt. Geprüft werden können Temperaturempfindlichkeit, Pigmentbildung, Vitaminabhängigkeit, NaCl-Empfindlichkeit, Enzymaktivitäten, Haaperforation, pH-Änderung u. a. Parameter. Dazu werden spezielle Nährböden benötigt: Kartoffel-Dextrose-Agar, Hafermehlagar, polierter Reis, Wort-Agar, Czapek-Dox-Agar, Harnstoff-Agar, *Trichophyton*-Agar Nr. 1 – 7, NaCl-supplementierte Agar, Bromkresolpurpur-Milch-Agar u. a.

Katzenmikrosporie – ein immer noch aktuelles Problem

Ute Siesenop

Institut für Mikrobiologie an der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Verbreitung

Mikrosporien stellen in zunehmendem Maße ein Problem in Katzenhaltungen und Katzenschulen dar. Dies nicht zuletzt aufgrund des zoonotischen Charakters des Erregers und dem damit verbundenen hohen Infektionsrisiko des Besitzers.

Zusätzlich bereitet die klinische Diagnose der Erkrankung erhebliche Schwierigkeiten, da eine große Anzahl Katzen eine latente Infektion aufweist, die mit lediglich geringer oder sogar fehlender Symptomatik einhergeht. Erst die Erkrankung des Besitzers führt zur Suche nach der Infektionsquelle und zur Untersuchung der Katzen.

Etwa 22% der zur mykologischen Untersuchung an unser Institut eingesandten Hautgeschabsel wiesen einen Befall mit Dermatophyten auf. Das Untersuchungsmaterial ist in der Routinediagnostik naturgemäß sehr inhomogen und stammte von Katzen,

die als Einzeltiere gehalten wurden, wie auch von Katzen aus Zuchten oder Tierheimen. Teils dienten die Untersuchungen zum Nachweis von Dermatophyten, teils zum Ausschluss. Eine Studie zeigte, dass Katzen, die in Katzenschulen oder Tierheimen gehalten werden, zu einem noch höheren Anteil – auch bei gesund erscheinenden Tieren – eine Besiedlung mit Hautpilzen aufweisen (39% bzw. 46%). Zuchtstationen und Ausstellungen stellen daher immer eine potenzielle Infektionsquelle für gesunde Katzen dar.

M. canis ist äußerst gut an die Katze angepasst und der wichtigste Hautpilz bei der Katze. Ca. 96% der bei der Katze nachgewiesenen Dermatophyten wurden als *M. canis* differenziert. Der schnelle Nachweis und die sichere Identifizierung des Erregers sind für die erfolgreiche Behandlung eines Tieres bzw. die erfolgreiche Sanierung eines Bestandes ebenso wichtig wie eine konsequent durchgeführte Therapie und Desinfektion.

Probenahme und Untersuchung

Eine effiziente Diagnostik beginnt mit einer optimalen Probenahme und geeignetem Untersuchungsmaterial. Bei latent infizierten Tieren ist die Probenahme schwierig. In diesen Fällen empfiehlt sich zur Probenahme die McKenzie-Zahnbürstenmethode. Bei dieser Entnahmetechnik wird die gesamte Katze mit einer neuen, sauberen Zahnbürste gekämmt. Die ausgekämmten Haare gelangen zur mykologischen Untersuchung. Auf diese Weise ist der sichere Nachweis von Hautpilzen im Fell von latent infizierten Katzen möglich.

Die mykologische Untersuchung umfasst die mikroskopische und kulturelle Untersuchung des gewonnenen Materials. Durch eine Optimierung der Untersuchungsmethoden ist ein schneller Nachweis des Erregers möglich geworden. So führt die mikroskopische Untersuchung mittels optischem Aufheller (Blanco-phor®) schon nach wenigen Stunden zum Nachweis von Dermatophyten. Dieses bedeutet einen frühen Behandlungsbeginn für die infizierten Tiere. Durch die mikroskopische Untersuchung sind Hautpilze in ca. 40% der kulturell hautpilzpositiven Proben nachweisbar.

Trotzdem ist die kulturelle Untersuchung eines Hautgeschabsels unerlässlich, da die Kultur zum einen deutlich sensitiver ist als die Mikroskopie, zum anderen erlaubt sie eine Erregerbestimmung. Die Differenzierung der Hautpilzspezies ist für den Abschluss apathogener Hautpilze, für den Einsatz von Impfstoffen oder die Beantwortung epidemiologischer Fragen von Bedeutung. In der Regel kann schon innerhalb einer Woche der kulturelle Nachweis von Hautpilzen erfolgen. Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse vieler Jahre zeigt, dass in etwa 22% aller eingesandten Hautgeschabsel von Katzen Dermatophyten nachweisbar waren. In ca. 96% wurde *M. canis* differenziert.

Therapie und Sanierung

Die erfolgreiche Therapie einer Mikrosporie sollte die orale Therapie mit Itraconazol, Ketoconazol oder Griseofulvin sowie die mehrmalige Waschung mit Enilconazol umfassen. Alternativ ist eine Vakzination mit einem inaktivierten *M. canis*-Impfstamm möglich. In keinem Fall kann auf eine umfassende Desinfektion der Umgebung der Katze verzichtet werden, da die Sporen an den ausgefallenen Haaren die Hauptinfektionsquelle für andere

Tiere und die Besitzer darstellen. Der Sanierungserfolg ist in hohem Maße abhängig von der konsequenten Durchführung dieser Desinfektion und damit von der Einsatzbereitschaft und der Zuverlässigkeit der Tierbesitzer. Es wurden verschiedene fungizide Wirkstoffe getestet, die alle teils gute Sanierungserfolge erbrachten. Unabhängig von dem eingesetzten Desinfektionsmittel ist eine Sanierung oft nur langfristig zu erreichen und die Quote der abgebrochenen Sanierungen ist hoch.

MALDI-TOF MS (Massenspektrometrie) zur Identifizierung von Bakterien und Pilzen inklusive Dermatophyten

Marcel Erhard, Wibke Kallow, Stefan Sauermaun

AnagnosTec Gesellschaft für Analytische Biochemie & Diagnostik mbH, Luckenwalde

Die Kombination aus MALDI-TOF MS (**Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry**) und AnagnosTec „**SARAMIS**“ – (**S**pectral **A**Rchiving **A**nd **M**icrobial **I**dentification **S**ystem), einer Software und Datenbank, stellt ein neues und schnelles Verfahren zur Identifizierung von Bakterien und Pilzen dar. Bei diesem Verfahren werden die Proben ohne Aufreinigungsschritte präpariert und vermessen. Im Ergebnis erhält man ein eindeutiges sog. „fingerprint“-Massenspektrum vom untersuchten Mikroorganismus. Dieser „fingerprint“ ist individuell und kann zur Identifizierung von Spezies, Subspezies bis hin zum Stamm herangezogen werden. In den erzeugten Spektren werden Genus-, Spezies-, Typ- und Stamm-spezifische Signale detektiert.

Probenvorbereitung

Bei der Probenvorbereitung werden geringste Mengen des Zellmaterials von der AGAR-Platte aufgenommen, auf den MALDI-TOF MS-Probenträger übertragen und zusätzlich zu jeder Probe noch 0,3 µl der notwendigen Matrixlösung pipettiert. Nach 1–2 Minuten sind die Proben auf dem Träger getrocknet und in Matrixkristallen eingeschlossen. Die bestückte Probenplatte wird ins Massenspektrometer eingeschleust und die Messung wird gestartet.

Massenspektrometriemethode

Bei der MALDI-TOF MS werden die Biomoleküle in einer Matrix eingebettet und mittels eines Lasers desorbiert und ionisiert. Die so erzeugten Ionen in der Gasphase werden dann mittels eines elektromagnetischen Beschleunigungsfeldes beschleunigt und nach 1,2 m Flugweg zeitabhängig detektiert. Nach vorheriger Kalibrierung lassen sich den Flugzeiten Massen zuordnen.

Nach der automatischen Messung der Proben werden die Spektren automatisch mittels Baseline correction und smooth bearbeitet und die relevanten Peaks beschriftet. Diese detektierten Peaks werden in Form von Massenlisten an die SARAMIS-Software übergeben und gegen eine Datenbank ausgewertet.

Auswertung und Identifizierung

In der SARAMIS-Software werden die Massenspektren archiviert und auf Wunsch identifiziert. Somit können neue Isolate gegen selektive Daten verglichen und zuverlässig erkannt werden. Bei der Auswertung wird auf detektierte Massensignale in Kombina-

tion mit ihrer taxonomischen Spezifität zurückgegriffen. Es erfolgt nur ein Spektrenvergleich hinsichtlich der relevanten Signale auf Genus-, Spezies-, Subspezies oder Typebene ohne Berücksichtigung der Signalintensitäten. Ein Hauptteil der detektierten Signale repräsentiert Ribosomenproteine. Deren Anwesenheit ist überwiegend wachstumsphasenunabhängig.

Die SARAMIS-Datenbank enthält zurzeit ca. 21000 Datensätze, welche als Referenzen zur Identifizierung herangezogen werden können. In Zusammenarbeit mit klinischen Kooperationspartnern, dem RKI (Robert-Koch-Institut Berlin), der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), Veterinärinstituten und weiteren Life Science Partnern erfolgt ein kontinuierlicher Datenaustausch und die Erweiterung der SARAMIS-Referenzdatenbanken.

Das Potenzial der Methode kann durch folgende Vorteile beschrieben werden:

- einsetzbar für alle Bakterien und Pilze,
- Nachweisgrenze: ~100 Zellen,
- keine Vorauswahl von Medien, Wachstumsstadien, Reagenzien oder Reaktionen (Antikörper, Primer),
- Verwandtschaften zwischen Organismengruppen werden erkannt (Klassifizierung neuer Erreger, Mutantanalyse),
- sehr schnelle Methode
 - Probenvorbereitungszeit kürzer als 60 Sekunden
 - geringe Messzeit
 - automatisierte Auswertung
- Möglichkeit zur Analyse von Mischproben,
- geringe Einflüsse von Wachstumsbedingungen,
- Verfügbarkeit von weiteren Applikationen zur Analyse von speziellen Resistenzmarkern, Toxinen, Seren und Geweben
- automatisierbar (Software ist vorhanden),
- Proben sind nach der Fixierung auf dem Probenträger mehrere Wochen stabil,
- niedriger Preis.

Die Präsentation demonstriert das Potenzial der Methode anhand von Dermatophyten. Dieses beinhaltet neben der einfachen und schnellen Probenvorbereitung die Messung, die Auswertung im SARAMIS-System mittels Superspektren und weiterführenden Clusteranalysen.

Anwendungsbeispiele der DNA-Diagnostik von Pilzen

Siegrid Krause, Anke Witt

DNA-Diagnostik Nord GmbH, Rostock-Warnemünde

Molekularbiologische Pilz-Diagnostik

Die Spezifität eines PCR-Tests liegt in Genabschnitten, die nur im gesuchten Organismus vorkommen. Der Grad der Spezifität ist frei wählbar. Es können artspezifische Abschnitte, z. B. von *Candida albicans*, oder gruppenspezifische Abschnitte, z. B. Nachweis der Gattung *Aspergillus*, gewählt werden. Der Unterschied der PCR zu konventionellen Nachweismethoden (Mikrobiologie, Mikroskopie) liegt darin, dass nur gezielt nach bestimmten Spezies oder Gattungen gesucht werden kann, d. h. dass diese, z. B. *Aspergillus fumigatus* oder auch *Stachybotrys chartarum*, bestätigt oder ausgeschlossen werden können.

Nachweis von Mykotoxinbildnern

Mykotoxine sind Stoffwechselprodukte niederer Pilze und anderer Mikroorganismen, die gegen andere Organismen, insbesondere Vertebraten, stark giftig wirken. Es sind heute mehr als 50 Mykotoxin-bildende Pilze bekannt. Neben *Aspergillus ochraceus* benennt die Fachliteratur *Penicillium verrucosum* als zweite Pilzspezies, die unter geeigneten Bedingungen das Mykotoxin Ochratoxin A synthetisiert. Ochratoxin A befindet sich in pilzbefallenen Erdnüssen, grünen Kaffeebohnen und Getreide und führt nach oraler Aufnahme bei Tieren oder beim Menschen zu Leber- und Nierenschäden. Die toxische Wirkung von Ochratoxin A beruht auf einer Hemmung des Leberphosphorylase-Enzymsystems.

Nachweis von Bauholz- und Schimmelpilzen

Holzerstörende Pilze und Schimmel sind unerwünscht in Häusern, zum einen als Materialzerstörer und zum anderen als Gesundheitsrisiko für den Menschen. Die Identifizierung der Gattungen und Arten bildet hierbei die Grundlage für die Einschätzung der Gefährdung. Objektiv diagnostizierbar und kostengünstig kann eine Identifizierung über vorhandene DNA des Pilzes direkt aus dem Material realisiert werden. Nach kürzester Zeit liefert die PCR Ergebnisse für eine Bestätigung oder den Ausschluss eines Befalls mit Echtem Hausschwamm oder anderen wichtigen Pilzgattungen oder -spezies (Tab. 1).

Tab. 1 Etablierte Nachweissysteme von Makro- und Mikropilzen

PCR-Systeme Bauholzpilze speziespezifisch	gattungsspezifisch
Echter Hausschwamm (<i>Serpula lacrymans</i>)	Kellerschwämme (<i>Coniophora spp.</i>)
Wilder Hausschwamm (<i>Serpula himantioides</i>)	Blättlinge (<i>Gloeophyllum spp.</i>)
Weißer Porenschwamm (<i>Antrodia vaillantii</i>)	
Brauner Kellerschwamm (<i>Coniophora puteana</i>)	
Eichenporling (<i>Donkioporia expansa</i>)	
Zaunblättling (<i>Gloeophyllum sepiarium</i>)	
Schmalporiger weißer Porenschwamm (<i>Antrodia sinuosa</i>)	
Gelber Porenschwamm (<i>Antrodia xantha</i>)	
Eichenwirrling (<i>Daedalea quercina</i>)	
Muschelkrempling (<i>Tapinella panuoides</i>)	
PCR-Systeme Schimmelpilze speziespezifisch	gattungsspezifisch
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Alternaria</i>
<i>Stachybotrys chartarum</i>	<i>Fusarium</i>
	<i>Trichoderma</i>
	<i>Wallemia</i>
	Bläuepilze (<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Sydowia polyspora</i>)
	Moderfäulepilze (<i>C. globosum</i> , <i>H. grisea</i> , <i>P. setifera</i>)

Echter Hausschwamm gilt europaweit als der gefährlichste holzerstörende Pilz in Gebäuden. Ihn zweifelsfrei zu diagnostizieren hilft, Kosten zu sparen. Doch oft sind exakte morphologische oder mikrobiologische Bestimmungen durch die Baufachleute nicht möglich, weil kaum verwertbares Probenmaterial an der befallenen Stelle vorhanden ist oder das Erscheinungsbild eine Verwechslung zulässt. Eine neue Möglichkeit: die sichere Identifizierung über noch vorhandene DNA des Pilzes.

Neben den holzerstörenden Pilzen bilden die Schimmelpilze ein wichtiges Feld in der Arbeit von Sachverständigen, und auch so manchen Mieter interessiert, welcher Pilz sich in seiner Wohnung ausbreitet. Die Identifizierung erfolgt direkt aus dem Material – Tapete, Holz, Kunststoff u. a. –, gezielte Sanierungsmaßnahmen können schnell in Angriff genommen werden.

Nachweis humanpathogener Pilze mittels TaqMan-PCR

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes des Netzwerkes „Präsymptomatische Tumordiagnostik e.V.“ werden demnächst diverse TaqMan-PCR-Systeme entwickelt und etabliert. Ziel ist der Vergleich der herkömmlichen Real time-Technik mit neuen Real time-PCR-Verfahren, die von den Projektpartnern entwickelt werden.

Fusarien und deren Toxine in Getreide – wie groß ist die Gefahr

Hanna Wolf¹, Steinbach, P.²

¹ Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern, Rostock

² Landespflanzenschutzamt Mecklenburg-Vorpommern, Rostock

Pilze der Gattung *Fusarium* (F.) sind phytopathogen und können an Getreide und anderen Pflanzen verschiedene Krankheiten verursachen. Darüber hinaus sind zahlreiche Arten in der Lage, auch unter unseren gemäßigten Klimabedingungen Mykotoxine zu bilden. Die Toxinbildung ist häufig artspezifisch, so dass das Fusarienspektrum schon Hinweise auf die zu erwartenden Mykotoxine erlaubt. Potente Toxinbildner sind *F. graminearum* und *F. culmorum*. Allerdings ist die Fähigkeit zur Bildung dieser sekundären Stoffwechselprodukte zwar potenziell vorhanden, aber von verschiedenen Faktoren abhängig. Das sind z. B. Klima-verhältnisse, pflanzenbauliche Maßnahmen und Sortenwahl. Die nach bisherigen Erkenntnissen häufig bei uns vorkommenden Fusarientoxine sind die Trichothezene A und B, Zearalenon und Fumonisine. Sie können, wenn sie in Nahrungs- oder Futtergetreide vorkommen, Krankheiten bei Mensch und Tier verursachen. Es sind bei verschiedenen Nutztierarten spezifische Krankheitsbilder beschrieben worden. Bei den unter hiesigen ökologischen Bedingungen zu erwartenden Toxingehalten sind sie jedoch eher unspezifisch und gehen einher mit Leistungsdepressionen und Fruchtbarkeitsstörungen. Ein Carry over nach Verfütterung an lebensmittelliefernde Tiere in tierische Gewebe ist in der Regel nicht zu erwarten.

Um diesem Mykotoxinrisiko für Mensch und Tier Rechnung zu tragen, sind für bestimmte Mykotoxine zu tolerierende Höchst-

mengen in Lebensmitteln und Richtwerte in Futtermitteln festgelegt worden.

Seit 1999 wird die jährliche Getreideernte aus landeseigenem Anbau in Mecklenburg-Vorpommern systematisch auf Fusarien-toxine untersucht. Diese Ergebnisse sollen die Basis für eine fachlich fundierte Risikoeinschätzung bilden. Das Monitoring folgt somit dem Prinzip des Verbraucherschutzes, das Risiko schon zu Beginn der Lebensmittel-/Futtermittelkette zu erkennen und zu bewerten. Zahlreiche Bundesländer verfahren in gleicher Weise, so dass bundesweit ein guter Überblick über die jeweilige Situation besteht.

Diese Untersuchungen sollen auch dazu dienen, bei der Abklärung von Tierverlusten den Verdacht einer Beteiligung von Mykotoxinen objektiv einschätzen zu können.

In den Jahren 1999–2004 sind 514 in Mecklenburg-Vorpommern geerntete Getreideproben nach einer territorial repräsentativen Verteilung zur Untersuchung auf Mykotoxine ausgewählt worden. Die Probenahme erfolgte unmittelbar nach der Ernte. Es wurden 368 Proben Winterweizen und 146 andere Getreidearten (Roggen, Hafer, Triticale, Mais) untersucht. 89 Getreideproben stammten aus ökologischem Anbau.

Die mykologische Untersuchung diente der Ermittlung des Befallsgrades an Toxin bildenden Pilzen der Gattung *Fusarium*. Dabei wurde nach der von Nirenberg entwickelten Methode verfahren. Die Körner werden auf einen speziellen Nährboden (SNA-Agar) aufgelegt und 14 Tage bei 17 °C inkubiert.

Die Untersuchung auf die Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) erfolgte mit einem ELISA. Werte, die oberhalb der Bestimmungsgrenze des ELISA lagen, wurden mit einer chromatografischen Methode (HPLC) nachuntersucht. Im ELISA negative Mykotoxinbefunde wurden abschließend als negativ bewertet, da die HPLC erfahrungsgemäß ein gleich lautendes Ergebnis liefert.

Im Erntejahr 2002 wurde der Befall mit Toxin bildenden Fusarien mit 17,4% als mäßig, im übrigen Untersuchungszeitraum mit max. 9% als schwach eingestuft. Dominierende Fusarienart war im gesamten Untersuchungszeitraum *F. culmorum*, wenngleich in einzelnen Jahren *F. graminearum*, *F. poae* und *F. avenaceum* häufiger nachgewiesen wurden. Ein Vergleich zwischen Fusarienbefall und Niederschlagshäufigkeit zeigte, dass die westlichen Landesteile und die Küstenregion besonders betroffen waren, während die zentrale und östliche Region niederschlagsärmer und der Fusarienbefall geringer war. In 11,5% der 514 Proben wurde DON > 0,2 mg/kg (Nachweisgrenze der Methode) nachgewiesen. Von 368 Proben Winterweizen enthielten 46 = 12,5% DON in Konzentrationen > 0,2 mg/kg. Eine höhere Kontamination wurde in den Jahren 1999, 2002 und 2004 mit ca. 21% der Proben ermittelt. Der Höchstwert betrug in einer Probe aus dem Jahr 2004 3,4 mg/kg.

In allen übrigen positiven Proben lag der DON-Gehalt < 1 mg/kg und somit unter den Richtwerten in Futtermitteln für landwirtschaftliche Nutztiere.

In 146 anderen Getreidearten wurde erstmals im Jahr 2004 DON in bemerkenswerten Konzentrationen ermittelt. In Roggen, einer hinsichtlich des Fusarientoxingehaltes eher unauffälligen Getreideart wurden Höchstwerte bis zu 2,7 mg/kg nachgewiesen.

Zearalenon ist ein Mykotoxin, das im Untersuchungszeitraum in Mecklenburg-Vorpommern nur eine untergeordnete Rolle spielt. Von 514 Proben enthielten nur 12 = 2,7% > 25 µg/kg Zearalenon. Davon stammten 6 Proben aus dem Jahr 2002 mit einem Höchstwert von 236 µg/kg. Wiederum war bis auf eine Maisprobe ausschließlich Winterweizen kontaminiert. In den Jahren 2001 und 2003 wurde in keiner Probe > 25 µg/kg Zearalenon nachgewiesen.

Orientierende Untersuchungen auf Fumonisine in Getreide erbrachten keine messbaren Gehalte > 0,2 mg/kg. Damit werden bisherige Erfahrungen bestätigt, nach denen diese Mykotoxine vorwiegend in Mais und Maisprodukten vorkommen.

Ein Vergleich von Getreide aus ökologischem und konventionellem Anbau zeigte, dass alle positiven Mykotoxinergebnisse mit einer Ausnahme aus konventionellem Anbau stammten. Potente Toxinbildner wie *F. graminearum*, *F. culmorum* und *F. poae* kommen in Getreide aus konventionellem Anbau häufiger vor als in ökologisch angebautem Getreide.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Belastung mit den Mykotoxinen Deoxynivalenol und Zearalenon in den Erntejahren 1999 bis 2003 als gering, in 2004 als mäßig angesehen werden. Ein erhöhtes Risiko für Verbraucher und Tierbestände ist daraus nicht abzuleiten. Allerdings erlauben diese Befunde keine prognostische Aussage zur Mykotoxinbelastung, da die jährlichen Witterungsbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf Pilzwachstum und Mykotoxingehalt haben. Ebenso bestehen territoriale Unterschiede. So sind Getreideernten aus südlichen Bundesländern stärker belastet als im Norden. In Mecklenburg-Vorpommern deutet sich ein West-Ostgefälle an.

Trichophyton mentagrophytes – ein zoophiler Dermatophyt im Aufwind?

Pietro Nenoff

Laboratorium für medizinische Mikrobiologie, Mölbis

Erregerreservoir und klinisches Bild

T. mentagrophytes tritt als Erreger einer Dermatophytose bei Kindern in der Regel in seiner zoophilen Varietät auf. Infektionsquelle sind kleine Nagetiere („Kuscheltiermykose“), u. a. Meerschweinchen, Zwergkaninchen, Goldhamster, aber auch Mäuse, Ratten, Frettchen und selten sogar Chinchilla. Beim Menschen treten die Läsionen in der Regel erst an Händen und Unterarmen auf, wo die Erreger nach einer Tierberührung haften bleiben.

Infektionen durch die zoophilen Varietäten von *T. mentagrophytes* verlaufen stark entzündlich, im Kopfbereich oft im Sinne eines Kerion Celsi. Neuerdings wird dieser Erreger scheinbar vermehrt in Hautarztpraxen und mikrobiologischen Laboren isoliert. Betroffen von den Dermatophytosen sind meist Kinder und Jugendliche. Das klinische Bild wird von den vorbehandelnden Ärzten (Kinderärzte und Allgemeinmediziner) oft nicht einer

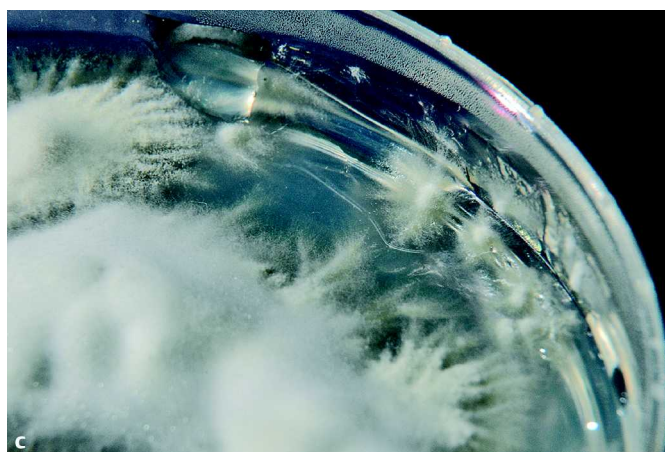
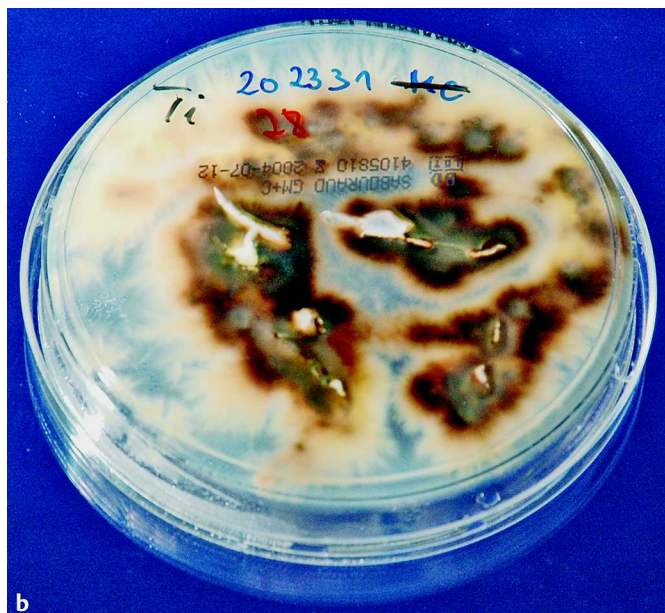


Abb. 1 Zoophiles Isolat von *Trichophyton interdigitale* (ehemals *Trichophyton mentagrophytes*). 16-jährige Patientin mit Tinea faciei. **a** 10 Tage alte Subkultur auf Sabouraud 4%-Glukose-Agar. **b** Charakteristische gelb-braune, z. T. farblose Kolonierückseite. **c** Detailaufnahme der Kolonien mit zentral flauschiger Oberfläche, peripher teils granulär, teils ausstrahlend.

Mykose bzw. Tinea zugeordnet, so dass im Einzelfall erst verspätet antimykotisch behandelt werden kann.

Taxonomie

Das Standardwerk der medizinischen Mykologie „Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt“ von Seeliger und Heymer aus dem Jahr 1981 unterscheidet bei der Spezies *T. mentagrophytes* die anthropophile Varietät *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* von den zoophilen Varietäten *T. mentagrophytes* var. *asteroides* (Reservoir Nager), *T. mentagrophytes* var. *erinacei* (Igel) und *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum* (Mäuse).

Entsprechend der aktuellen 2. Auflage des Atlas of clinical fungi von De Hoog et al. aus dem Jahr 2000 meint die Spezies-Bezeichnung *T. mentagrophytes* heute ausschließlich den zoophilen Erreger, eigentlich nur die sehr selten vorkommende Varietät *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*, der Erreger des sog. Mäusefavus. Dieser Dermatophyt wird nur von Mäusen auf den Menschen übertragen. Häufiger als mit *T. mentagrophytes* (*quinckeanum*) scheinen Mäuse in unseren Breiten jedoch mit der zoophilen Spezies *T. interdigitale* infiziert zu sein.

Die anthropophile Varietät von *T. mentagrophytes* (var. *interdigitale*), aber auch die weiteren zoophilen Varietäten (var. *asteroides*, var. *granulosum*) werden aufgrund der molekularbiologischen Klassifizierung bzw. der genotypischen Zuordnung mittels Sequenzierung variabler ribosomaler Genabschnitte nun zu einer gemeinsamen Speziesbezeichnung zusammengefasst, nämlich zu *T. interdigitale* (Abb. 1). Das ist aus klinischer Sicht mit Blick auf die Lokalisation der Dermatophytose – also oft Tinea capitis und Tinea corporis – zwar zunächst verwirrend, muss jedoch zur Kenntnis genommen werden.

Die ehemalige Varietät *T. mentagrophytes* var. *erinacei* dagegen wird heute als eigenständige Art *T. erinacei* eingeordnet. Letzterer Erreger ist ein sog. emerging pathogen und wird aktuell auch in Deutschland punktuell als Erreger stark entzündlicher Dermatophytosen beim Menschen nach Igelkontakt wieder vermehrt angezüchtet.