



Leibniz Institut  
für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie  
Hans-Knöll-Institut

## Das nationale Referenzzentrum für Invasive Pilzinfektionen (NRZMyk) als Partner für Klinik und Diagnostik

PD Dr. rer. nat. Kerstin Voigt

Frühjahrstagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft, 23.-24. Mai 2014, Bonn



NRZMyk



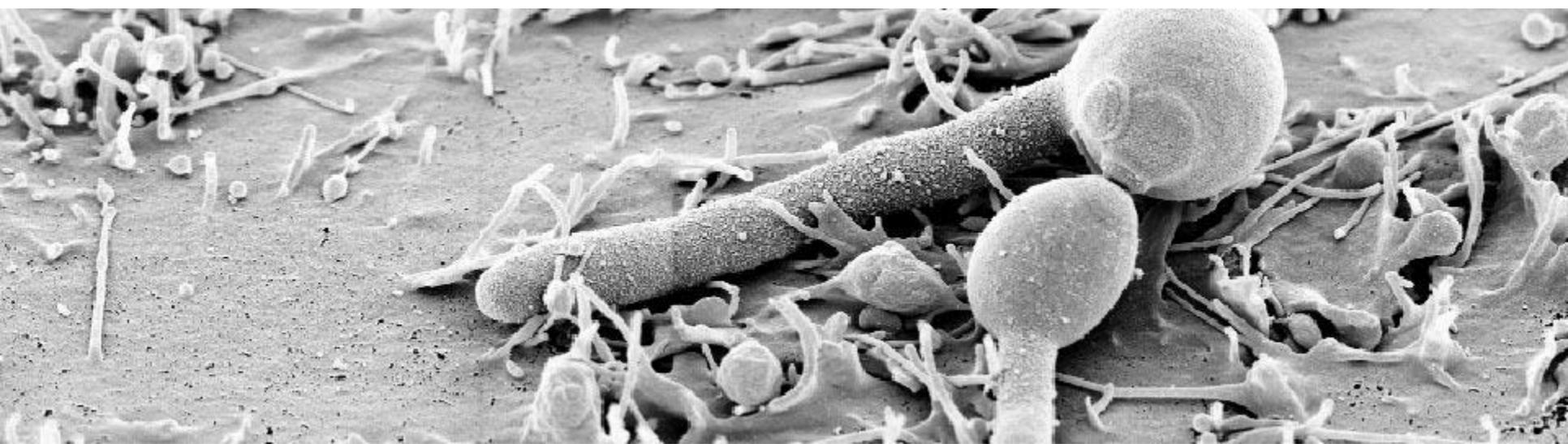
Leibniz  
Leibniz-Gemeinschaft



„Jena hat sich zu einem Zentrum für medizinische Mykologie entwickelt. (..) Es gibt nach der Wahrnehmung der Gutachter keinen Ort auf der Welt, wo eine so große Expertise versammelt ist.“  
*DFG-Schreiben, Begutachtung SPP1160 vom 13.8.2008*

„Jena hat sich im letzten Jahrzehnt zu einem der führenden Zentren für die Infektionsbiologie pathogener Pilze in Europa entwickelt“  
*DFG-Schreiben, Bewilligung SFB/TR124 vom 10.6.2013*

- gegründet 1992, seit 2003 Mitglied der WGL, ~ 360 Mitarbeiter
- Themenschwerpunkte: Naturstoffe, **Infektionsbiologie pathogener Pilze**



- national & international sichtbares Zentrum für mykologische Diagnostik & Epidemiologie
- kompetenter Ansprechpartner für Mikrobiologie, Klinik & ÖGD in Deutschland
- Bindeglied zwischen Klinik & Forschung zur Verbesserung des Managements invasiver Mykosen

# Verbundforschungsprojekte & Netzwerke

## Grundlagenforschung



SFB/TR124  
FungiNet  
(Jena/Würzburg)

DFG, Sprecher: **A. Brakhage**,  
Fördervolumen ~8 Mio. €



Graduiertenschule  
DFG/Exzellenzinitiative,  
Sprecher: **A. Brakhage**



## Klinische Forschung



BMBF/IFB, Mitglied des  
Vorstands: **O. Kurzai**  
Fördervolumen ~23 Mio €

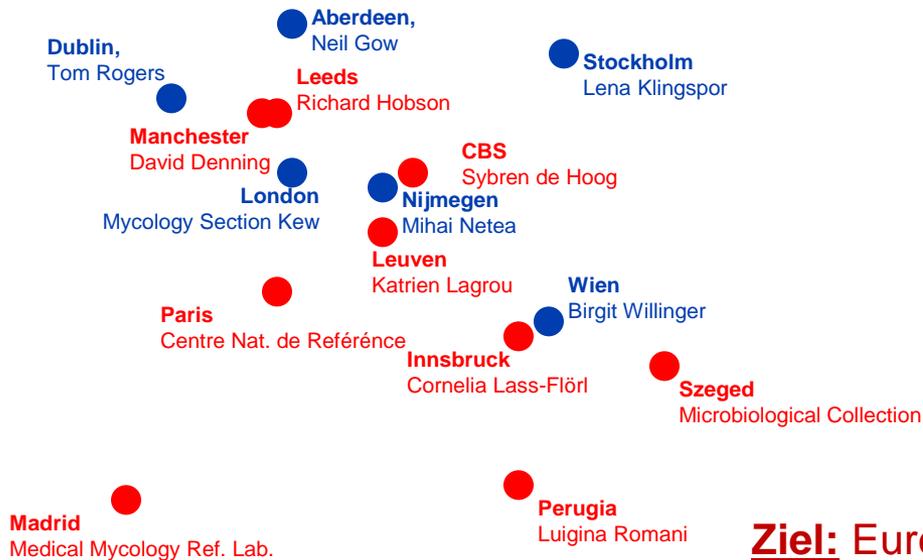
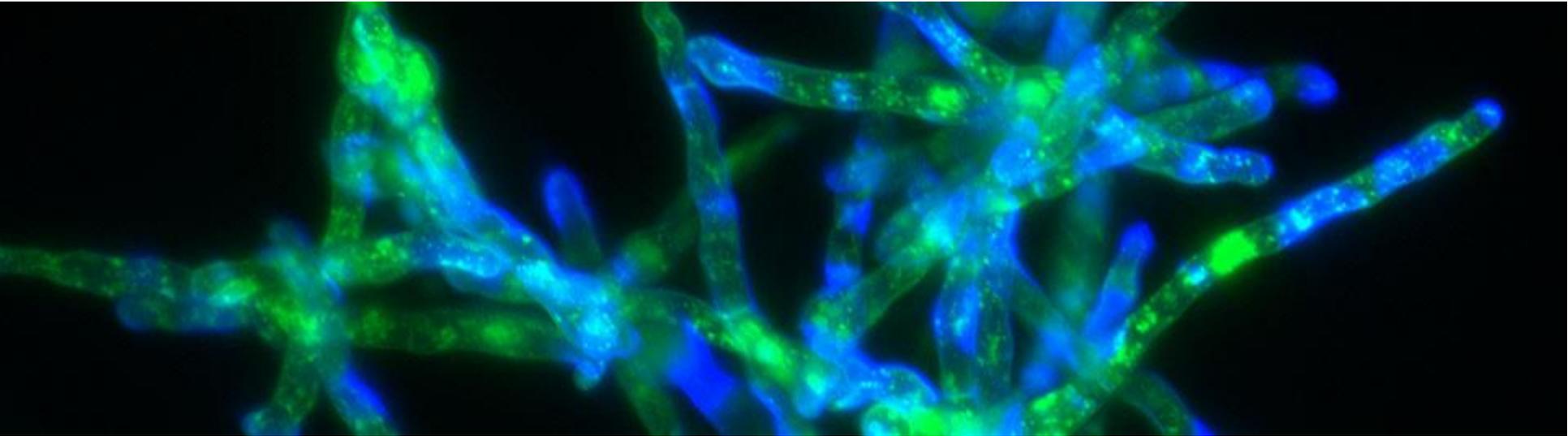


BMBF/Zwanzig20, Sprecher: **A. Brakhage**,  
Manager: **O. Kurzai**  
Fördervolumen ~45 Mio €



BMBF/Forschungscampus,  
Kernpartner: **HKI**,  
Fördervolumen ~35 Mio €

# Internationale Vernetzung



**Ziel:** European Mycology Reference Center Association



Institut für Medizinische Mikrobiologie,  
Universitätsklinikum Jena

Komm. Leiter:

Prof. Dr. med. Wolfgang Pfister



Laboratorien der Klinik für Hautkrankheiten,  
Universitätsklinikum Jena

Leiterin:

PD Dr. rer. nat. et med. Uta-Christina Hipler



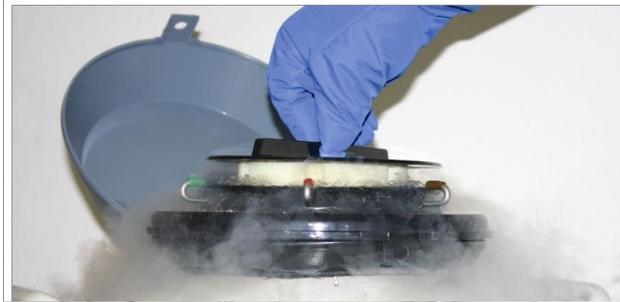
Molekularbiologische Laboratorien  
(Infektiologie/Immungenetik), Medizinische Klinik  
II, Universitätsklinikum Würzburg

Leiter:

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

# Jena Microbial Resource Collection JMRC

15.000 Pilzestämme



35.000 Bakterien





- 2010 hervorgegangen aus den Stammsammlungen des Pilzreferenzzentrums Jena und des HKI (Leitung: PD Dr. Kerstin Voigt)
  - 15.000 Pilzisolat  
darunter >6000 *Aspergillus spp.*, >3000 *Candida spp.*, >4000 Mucormycota
  - Mitglied  
*European Culture Collections Organization*  
*Consortium for the Barcode of Life*  
*World Federation of Culture Collections*
- gelistet im *World Data Center for Microorganisms (Ref.-No. 919)*
- Enge Kooperation mit DSMZ und *Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)*

# Team des NRZMyks: Leitung

---



Prof. Dr. med. Oliver Kurzai  
Leiter des NRZMyk



PD Dr. rer. nat. Kerstin Voigt  
Stellvertretende Leiterin Labor



Prof. Dr. med. Marie von Lilienfeld-Toal  
Stellvertretende Leiterin klinische Beratung



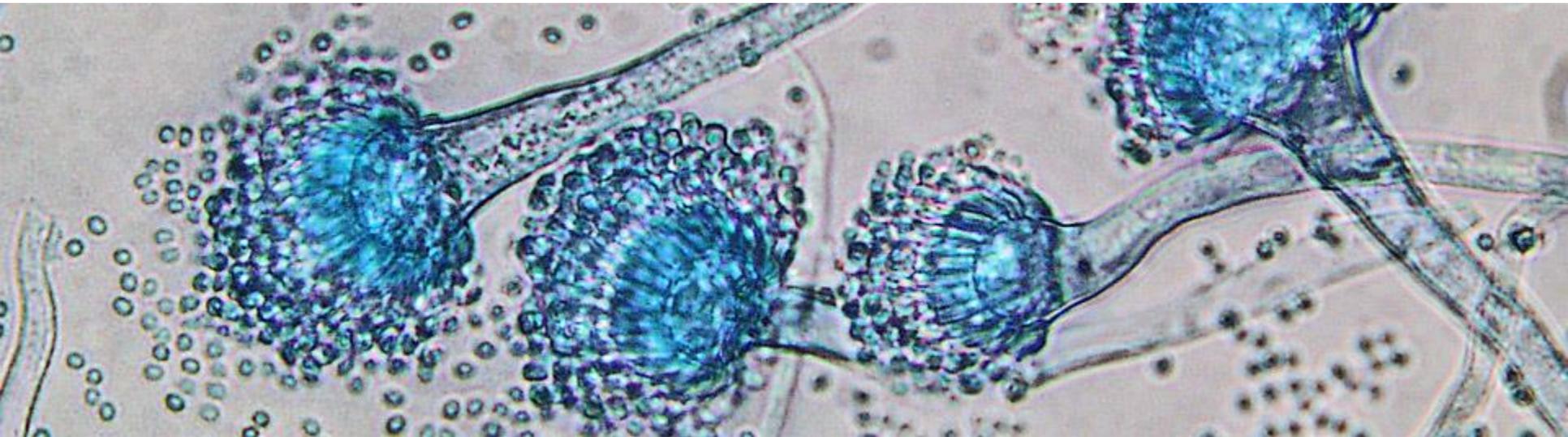
Dr. rer. nat. Kerstin Kaerger  
PostDoc



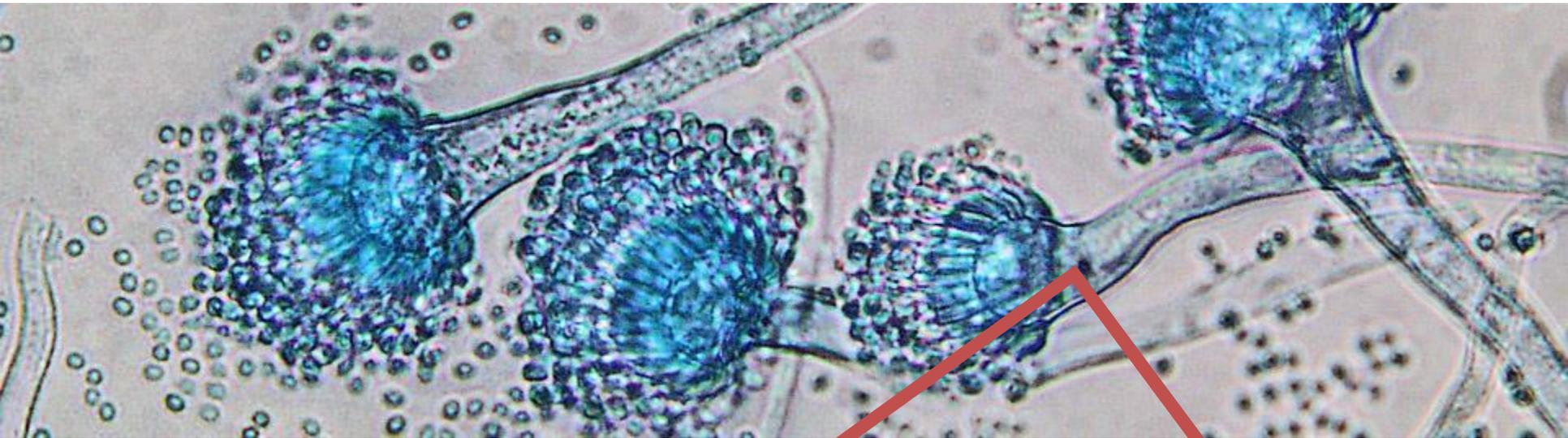
Dr. rer. nat. Grit Walther  
PostDoc



Christiane Weigel  
Technische Assistentin



1. Beratung zu Fragen der Diagnostik und Resistenzbestimmung von humanpathogenen Pilzen
2. **Beratung** zu Fragen der **Behandlung** invasiver Pilzinfektionen
3. **Speziesidentifizierung** von humanpathogenen Pilzen (kulturabhängige und – unabhängige Verfahren)
4. Speziesidentifizierung von Pilzen aus histopathologischen Präparaten mit molekularen Methoden  
genotypische und phänotypische Resistenztestung von humanpathogenen Pilzen mit Referenzmethoden
5. **Molekularbiologische Direktnachweise** von humanpathogenen Pilzen aus diagnostischen Materialien  
inklusive bioptischen Materialien und histopathologischen Präparaten (Paraffin-eingebettete Biopsien)
6. **Molekulare Feintypisierung** von humanpathogenen Pilzen bei Verdacht auf Ausbruchssituationen  
(molekulare Methoden für verschiedene Spezies, insbes. *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans/parapsilosis* und *Pneumocystis jirovecii* [aus DNA-Proben])
7. **Abgabe von Referenzstämmen** aus der Stammsammlung des Referenzzentrums *Jena Microbial Resource Collection* für diagnostische und wissenschaftliche Zwecke auf Anfrage

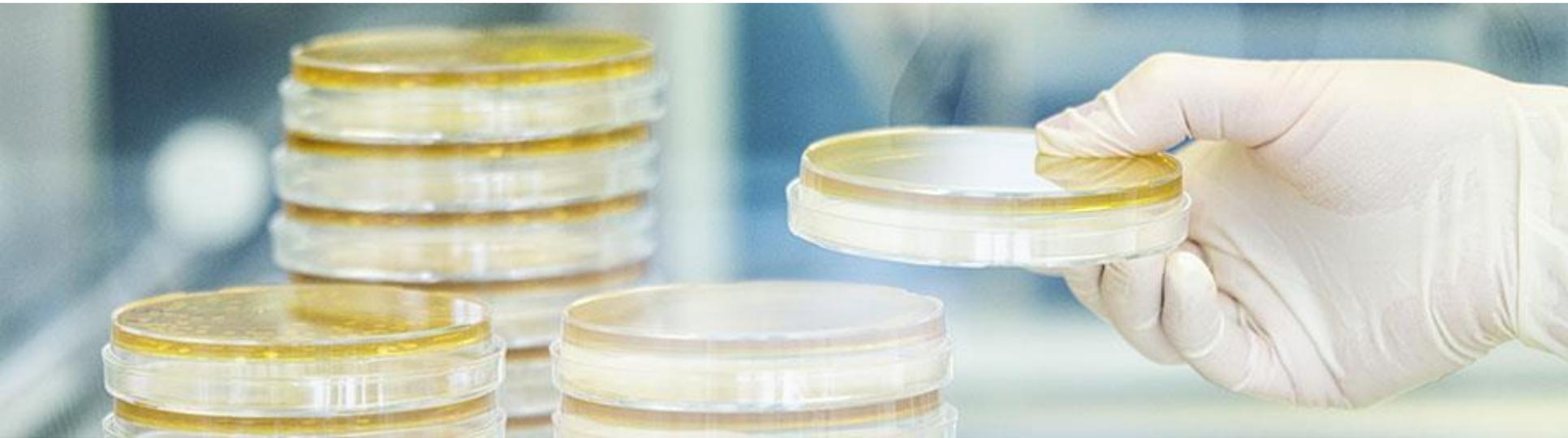


**Kostenfreie  
Serviceleistungen**

1. Beratung zu Fragen der Diagnostik und Resistenzbestimmung von humanpathogenen Pilzen
2. **Beratung** zu Fragen der **Behandlung** invasiver Fehzinfektionen
3. **Speziesidentifizierung** von humanpathogenen Pilzen (kulturabhängige und – unabhängige Verfahren)
4. Speziesidentifizierung von Pilzen aus histopathologischen Präparaten mit molekularen Methoden  
genotypische und phänotypische Resistenztestung von humanpathogenen Pilzen mit Referenzmethoden
5. **Molekularbiologische Direktnachweise** von humanpathogenen Pilzen aus diagnostischen Materialien  
inklusive bioptischen Materialien und histopathologischen Präparaten (Paraffin-eingebettete Biopsien)
6. **Molekulare Feintypisierung** von humanpathogenen Pilzen bei Verdacht auf Ausbruchssituationen  
(molekulare Methoden für verschiedene Spezies, insbes. *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans/parapsilosis* und *Pneumocystis jirovecii* [aus DNA-Proben])
7. **Abgabe von Referenzstämmen** aus der Stammsammlung des Referenzzentrums *Jena Microbial Resource Collection* für diagnostische und wissenschaftliche Zwecke auf Anfrage

# Hinweise für Einsender

---



**Vor Materialeinsendung** bitten wir um **telefonische Rücksprache unter 03641 532-1551**, um Probenmaterial, Versand und relevante Untersuchungen im Detail zu besprechen.

Bitte legen Sie der Sendung stets unser von Ihnen ausgefülltes **Einsendeformular** bei.  
Das Einsendeformular können Sie hier herunterladen: [www.nrzmyk.de](http://www.nrzmyk.de) [Einsendeformular \(34,1 KiB\)](#)

**Postanschrift:**

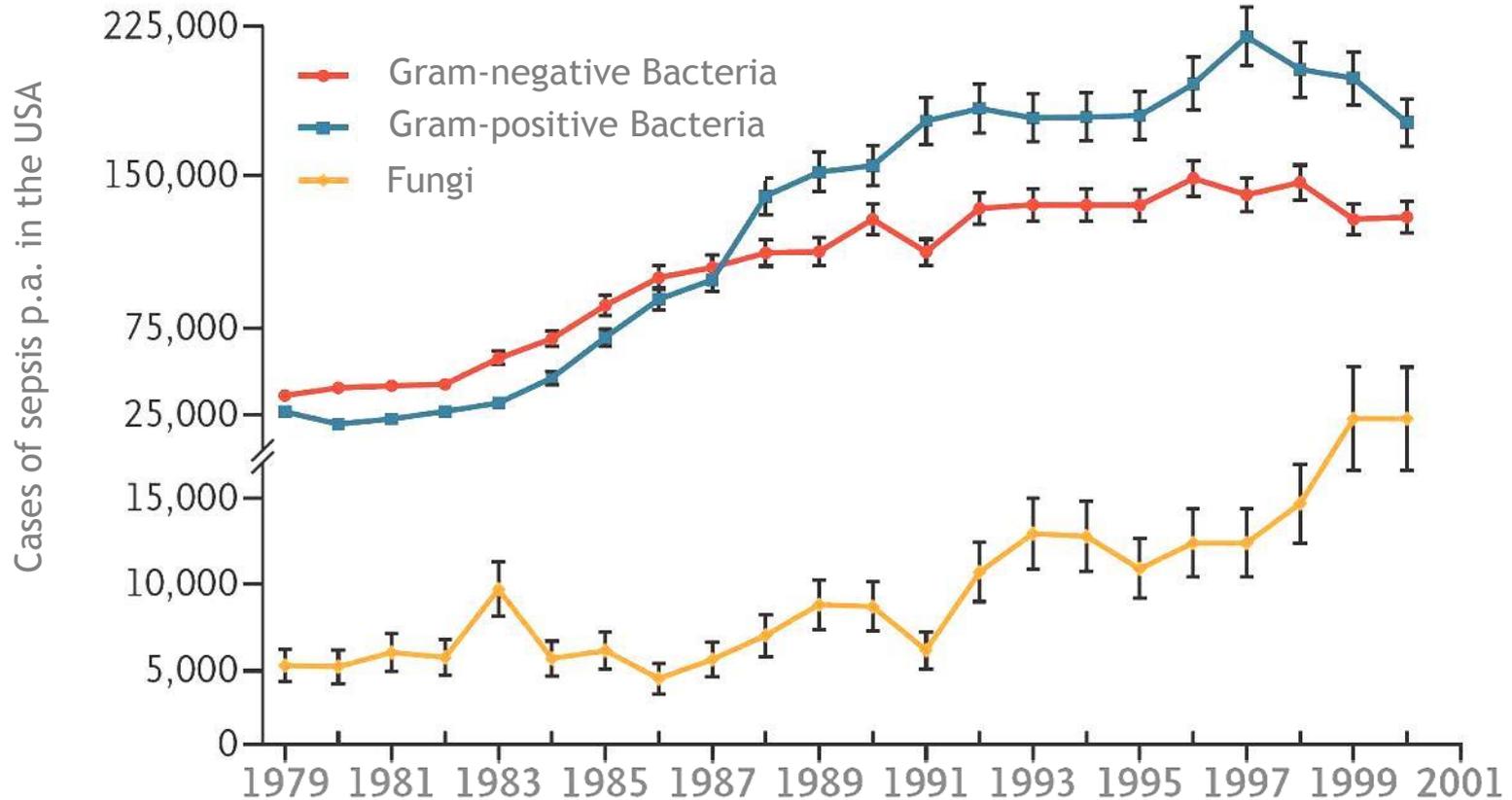
NRZMyk

Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - Hans-Knöll-Institut

Adolf-Reichwein-Straße 23

07745 Jena

# Invasive Mykosen nehmen zu



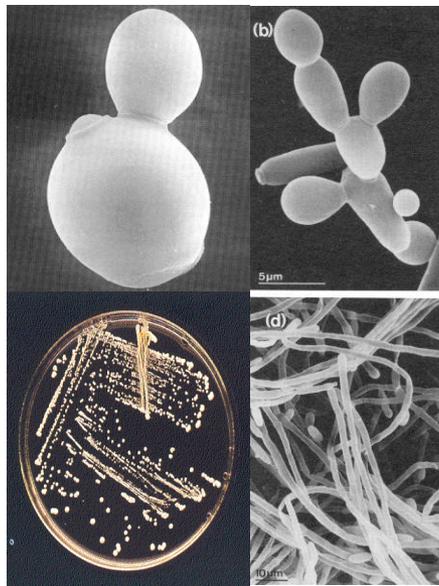
Martin et al, Epidemiology of Sepsis in the US 1979-2001 NEJM 2003

**Geschätzte Zahl der Pilze: ca. 1.500.000 Arten**

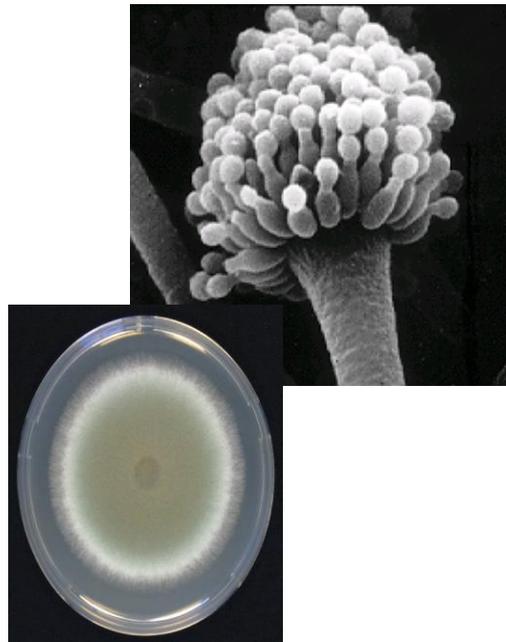
**Zahl der Pilze: ca. 400.000 Arten**

**Human-pathogene Pilze: ca. 150 (0,3 %)**

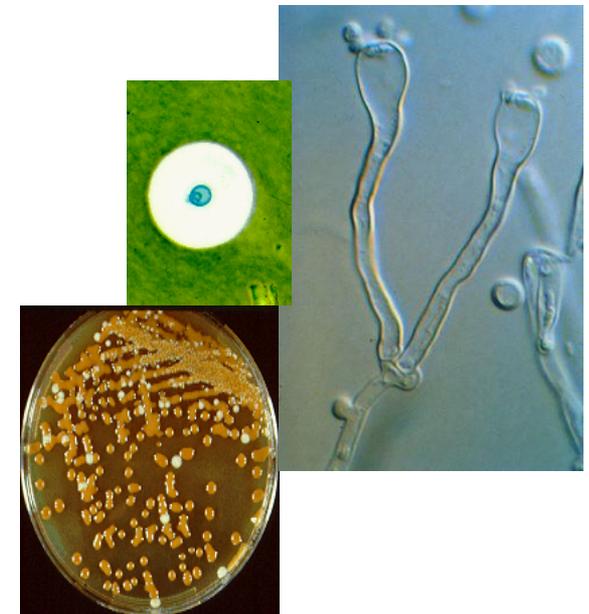
1. *Candida albicans*

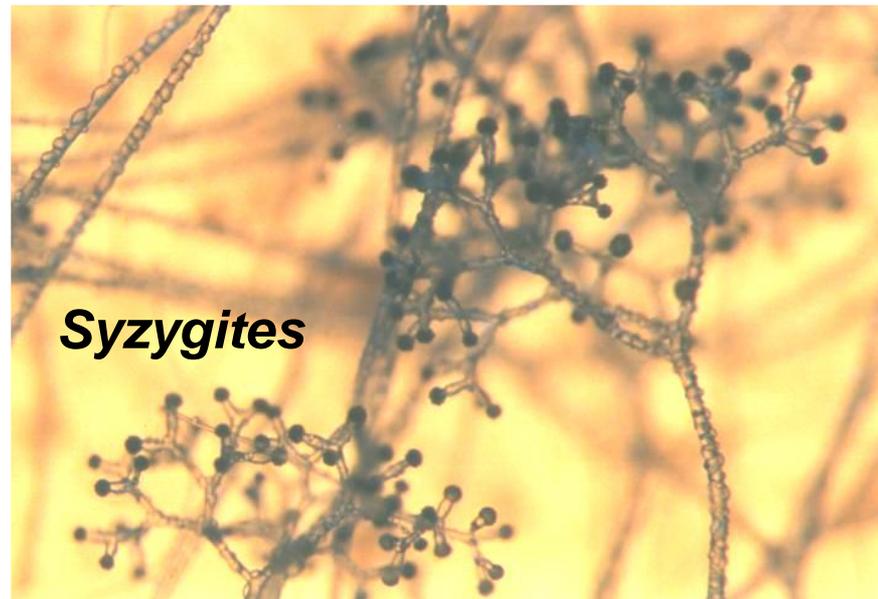
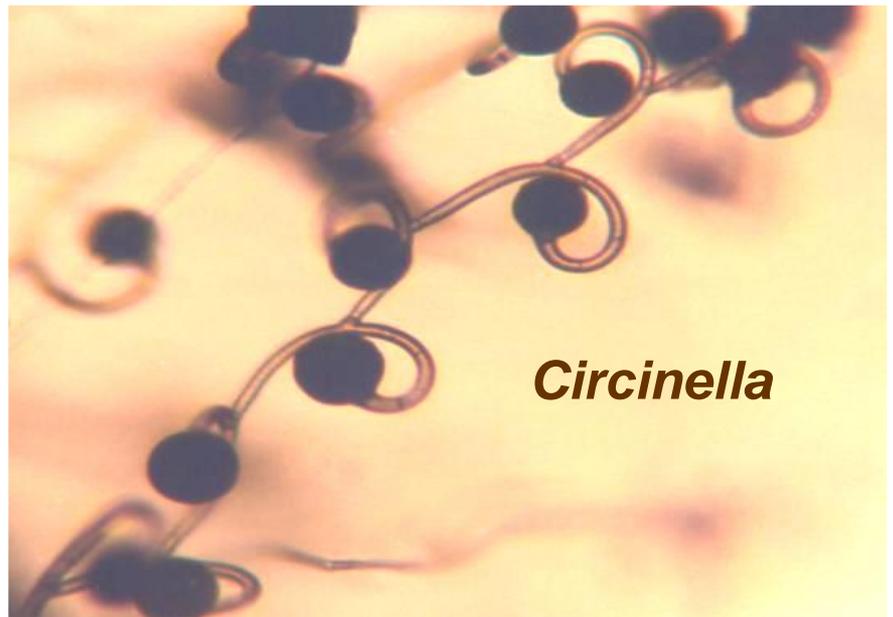
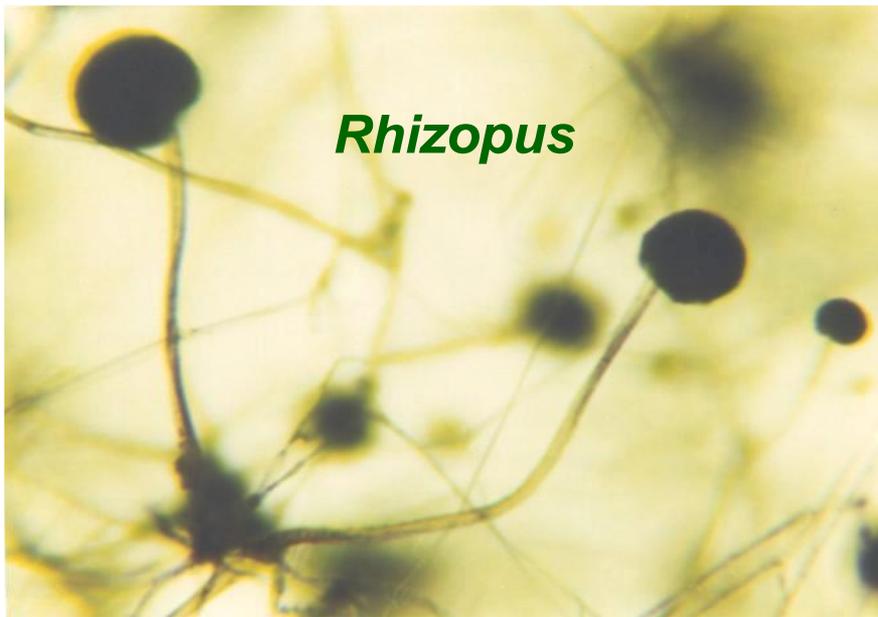


2. *Aspergillus fumigatus*

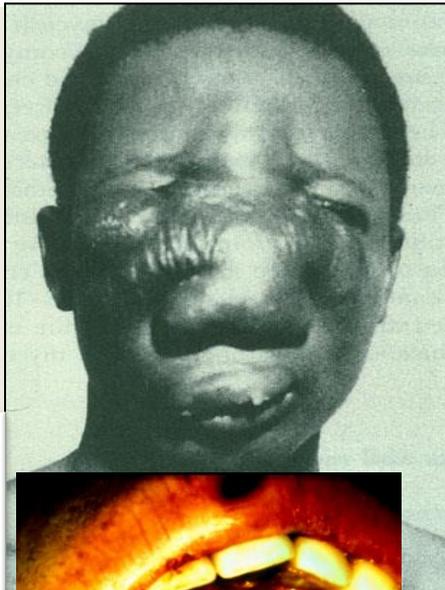


3. *Cryptococcus neoformans*

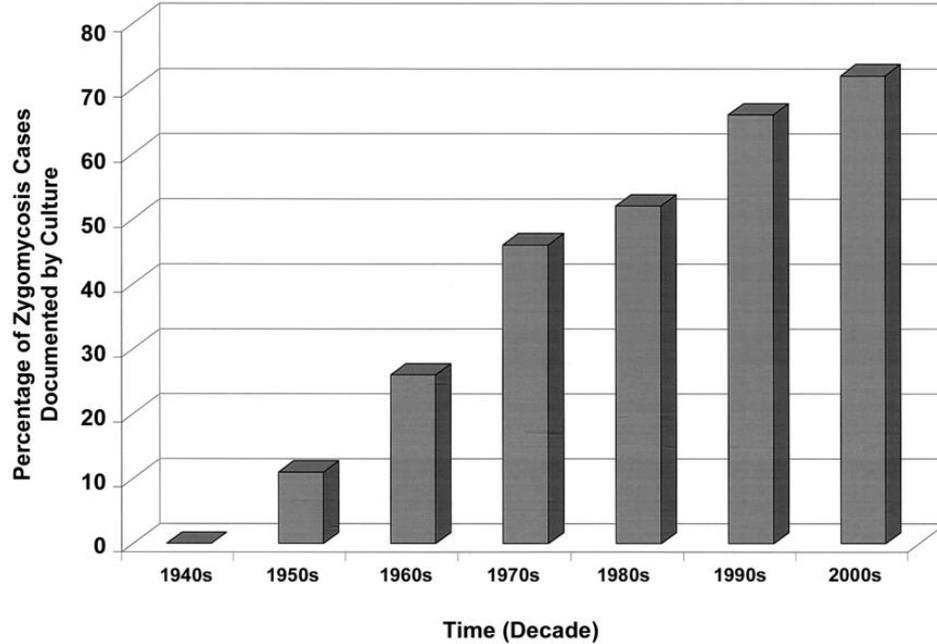




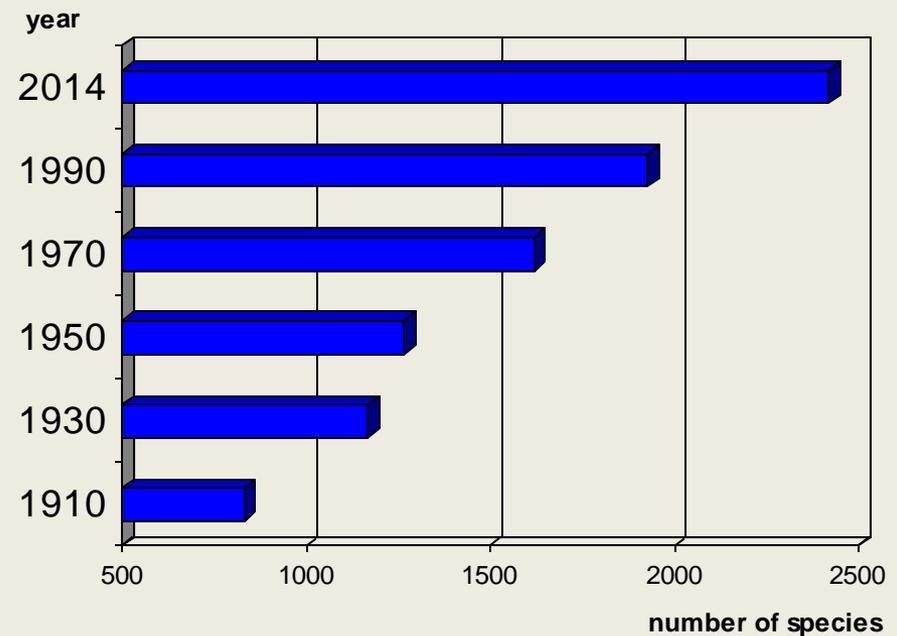
# Zygomycoses: gastrointestinal, rhinocerebral, cutaneous, pulmonary infections



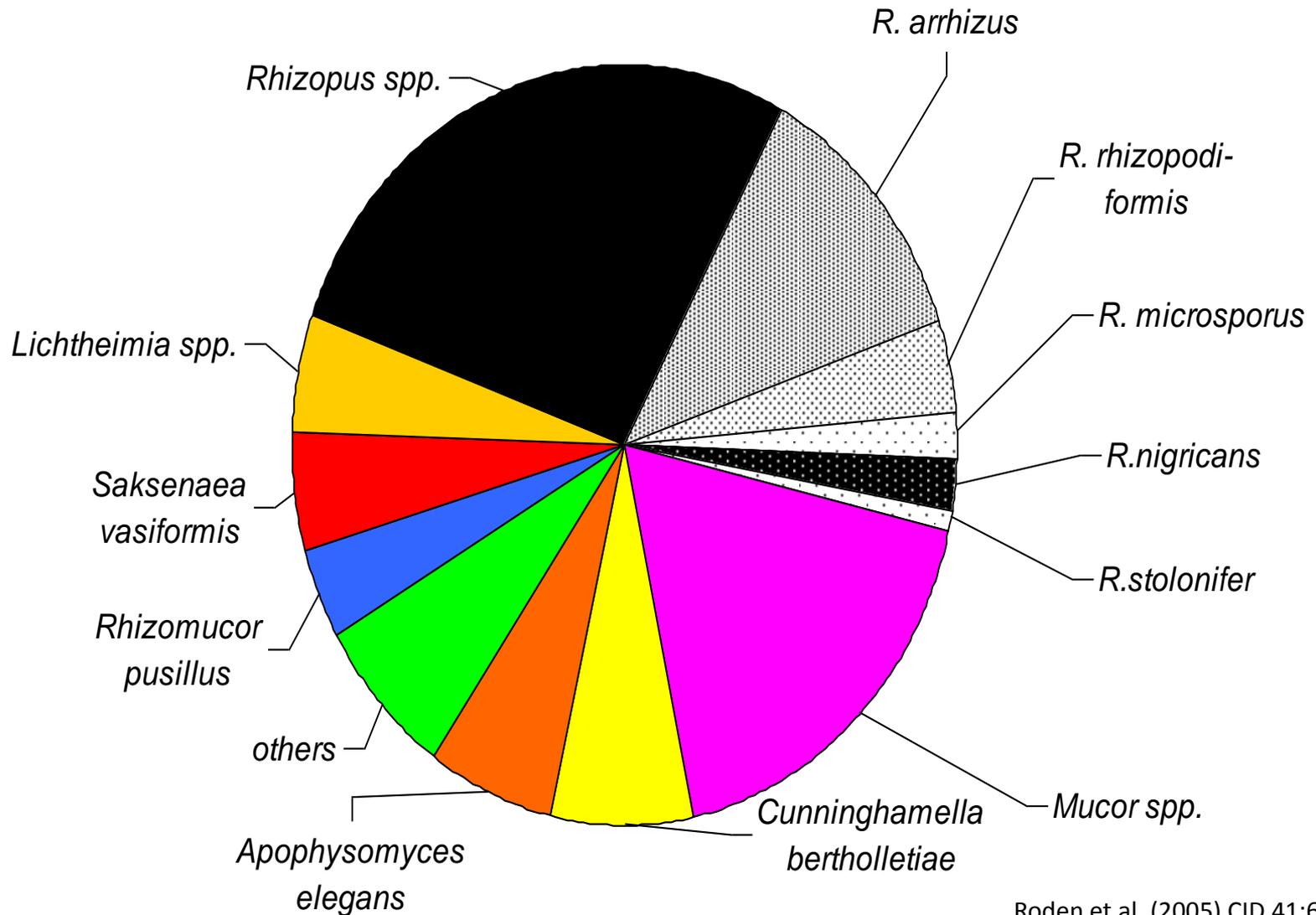
# Mucormykosen – eines der besten Beispiele zunehmender invasiver Mykosen



Roden et al. (2005) CID 41:634-653.



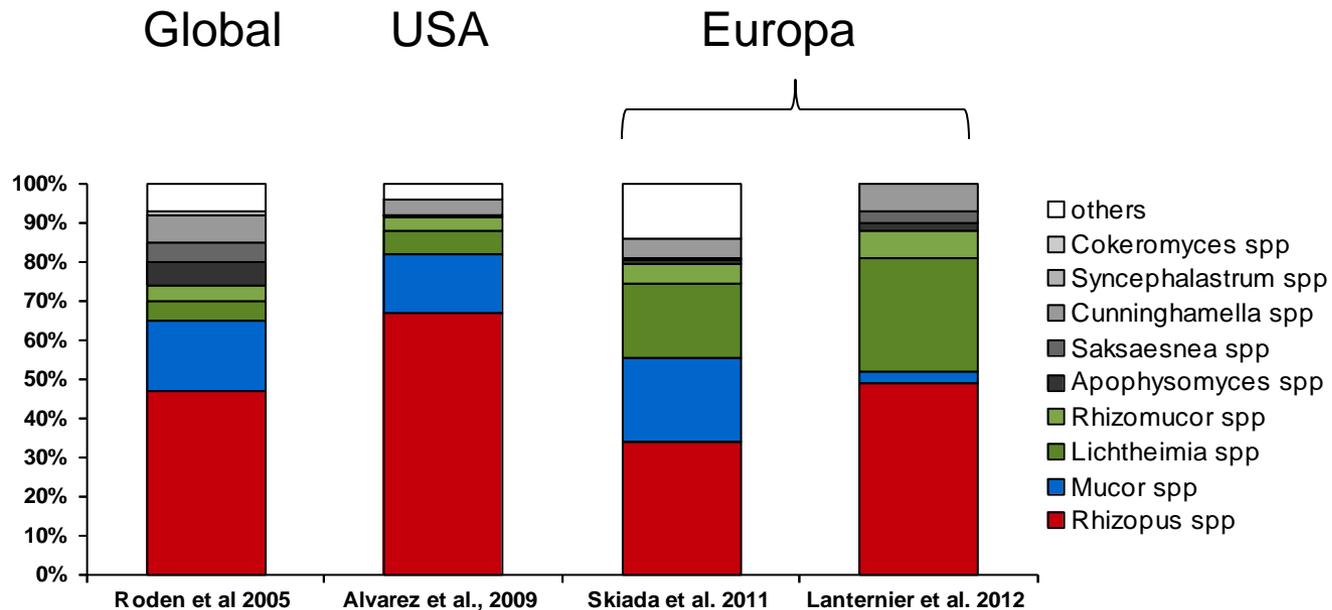
# Es sind 26 Erreger von Mucormykosen bekannt



Roden et al. (2005) CID 41:634-653.

# NRZMyk und Mucormykosen

Eines der wissenschaftlichen Fragestellungen des NRZMyks ist die Erhebung von Daten zum Auftreten von Mucormykosen

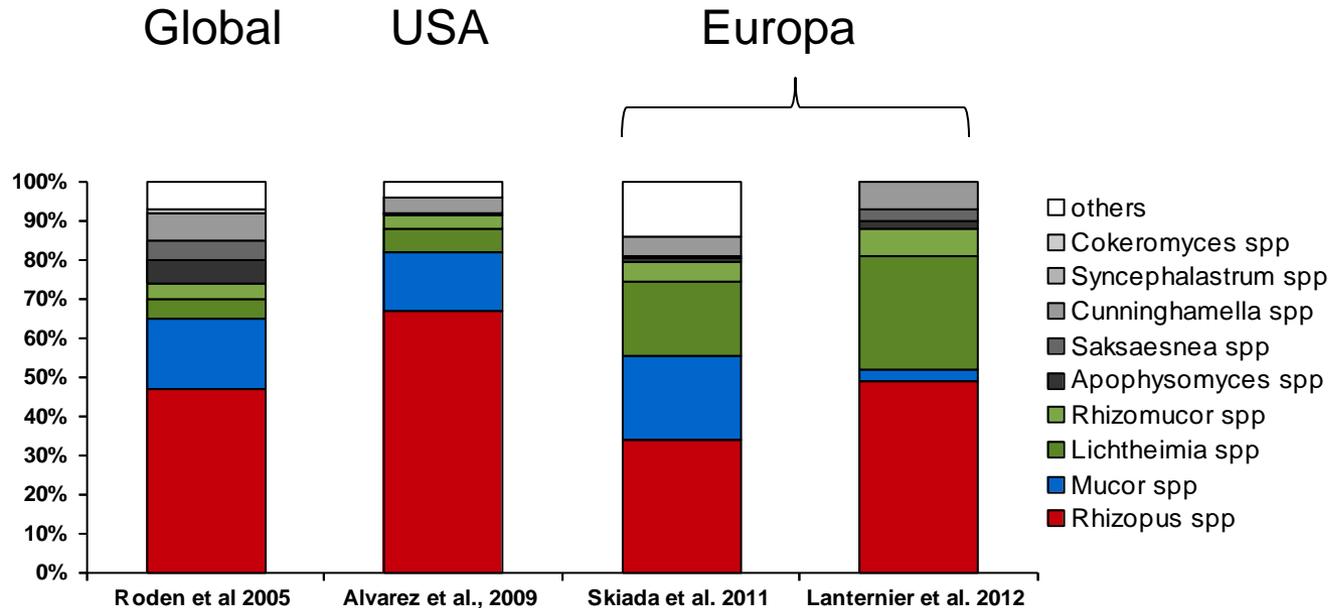


- Häufigster Erreger von Zygomykosen: *Rhizopus*

- *Lichtheimia* & *Mucor* = zweithäufigste Erreger in Europa

# NRZMyk und Mucormykosen

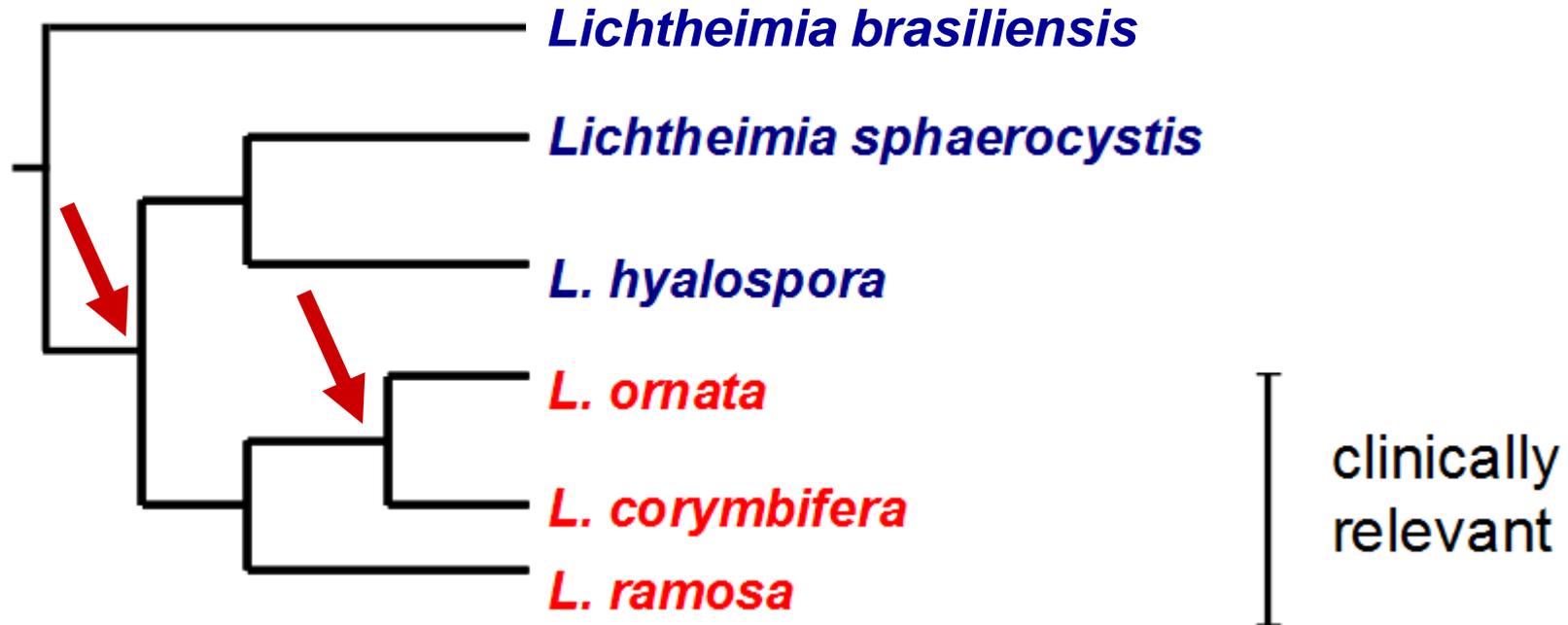
Eines der wissenschaftlichen Fragestellungen des NRZMyks ist die Erhebung von Daten zum Auftreten von Mucormykosen



- Häufigster Erreger von Zygomykosen: *Rhizopus*

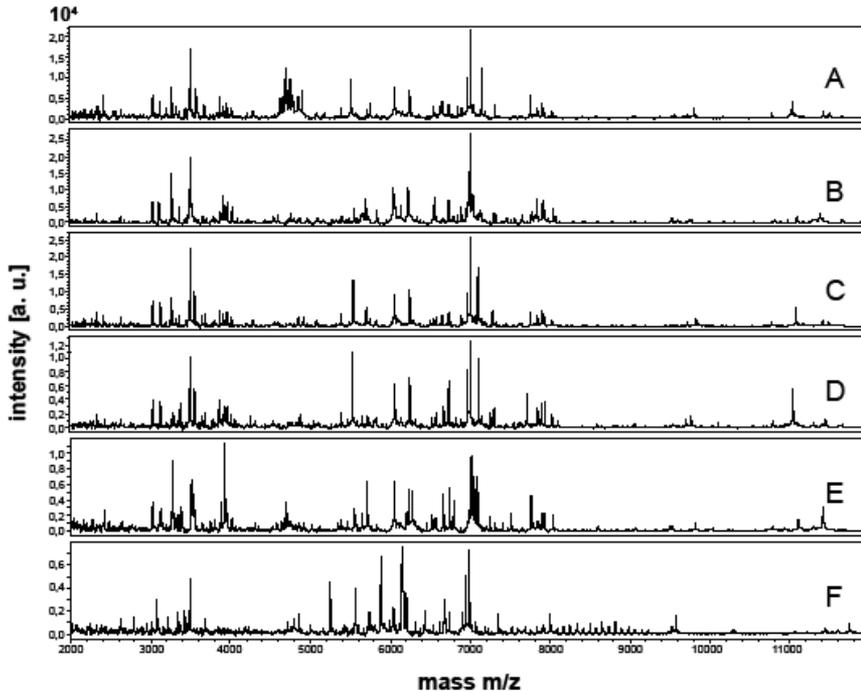
- *Lichtheimia* & *Mucor* = zweithäufigste Erreger in Europa

# Lichtheimia: nicht-pathogen versus pathogen



- 3 von 6 Arten sind humanpathogen

Schwartze et al., *Mycoses* in press.



Dendrogram generation  
MALDI Biotyper™ 2.0 (Bruker  
Daltonik GmbH, Germany)

Microflex LT mass spectrometer  
Daltonik GmbH, Germany)

Score values:

1. Species-level identification

3.0 – 2.5 -> highly probable

2.0 – 2.49 -> moderate

2. Genus-level identification

< 2.0

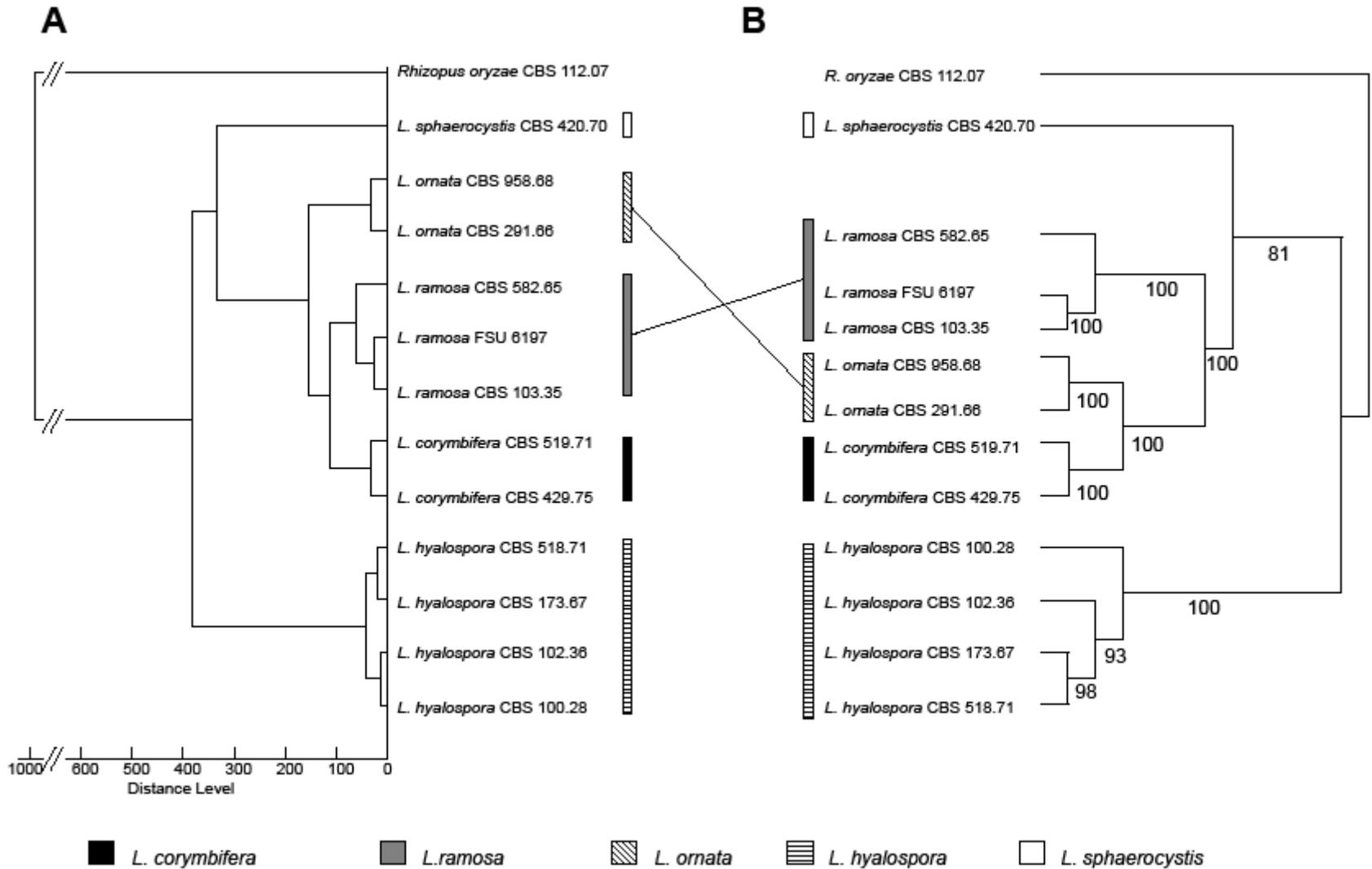
3. No match:

< 1.19

beyond family-level: 7 species used as  
negative control

Schroedl et al., *J Clin Microbiol* 2012.

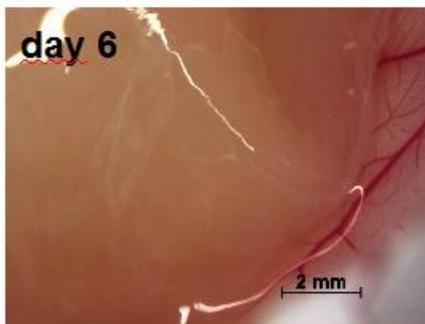
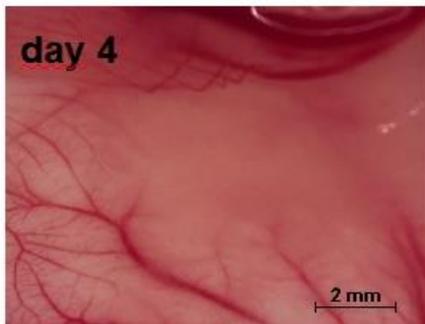
# Lichtheimia: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) - Time-Of-Flight (TOF)



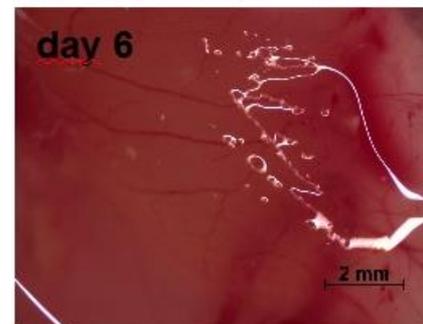
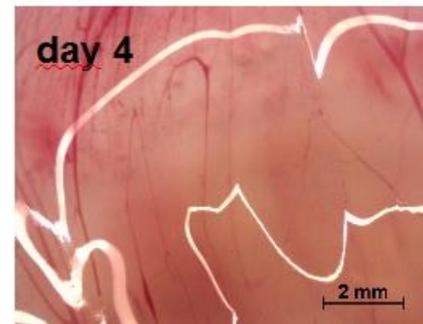
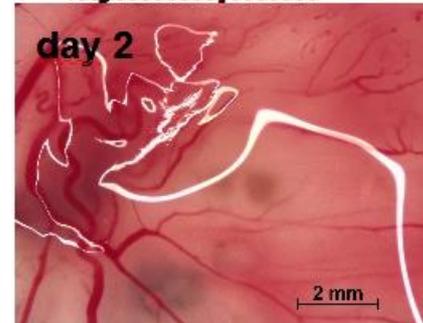
Schroedl et al., *J Clin Microbiol* 2012.

# *Lichtheimia*: Virulenz & Avirulenz korreliert mit Angioinvasion im Hühnereimodell

## *L. corymbifera*



## *L. hyalospora*



Schwartz et al., *PLoS ONE* 2012

## Genomstatistik

---

Genomgrösse (Mb)	33.6
Anzahl der Gene	11,614
Anzahl der Gene mit Introns	9,433
Anzahl der Introns pro Gen (median)	3
$\phi$ Transkriptgrösse (nt)	1,308
$\phi$ G+C Gehalt in den kodierenden Sequenzen	46.00 %
Anzahl nicht-kodierender RNA-Gene	197

---

Schwartze et al., *in rev.*

## Genomstatistik

Genomgrösse (Mb)	33,6
Anzahl der Gene	11,614
Anzahl der Gene mit Introns	9,433
Anzahl der Introns pro Gen (median)	3
$\phi$ Transkriptgrösse (nt)	1,308
$\phi$ G+C Gehalt in den kodierenden Sequenzen	46.00 %
Anzahl nicht-kodierender RNA-Gene	197

5 % der Gene kommen nur in *Lichtheimia corymbifera* vor

Schwartz et al., *in rev.*



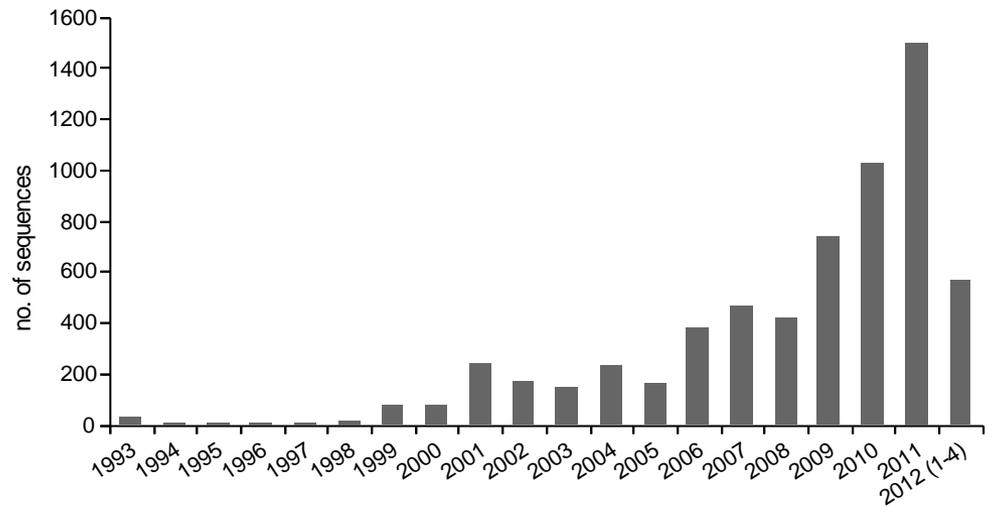
## *Molecular Barcoding in Mucorales*

**DNA barcode** = Eine kurze **DNA-Sequenz**, von einer uniformen Lokalität im Genom, genutzt zur Identifizierung von Arten

Schocht et al., *PNAS* 2013



## Molecular Barcoding in Mucorales



Kaerger et al., *Persoonia* 2013

## ITS barcoding

- 700 ITS Sequenzen von ca. 180 Arten (inkl. 140 Typ-Stämme)
- 5 bis 10 Stämme pro Art
- Kriterien für die Stammauswahl:
  - sowohl klinische als auch Umwelt-Proben
  - verschiedene geographische Herkunft
  - grosse Bandbreite an Lebensräumen (Habitaten)
- Alignment der ITS Barcodes in Subsets alignierbarer Sequenzen

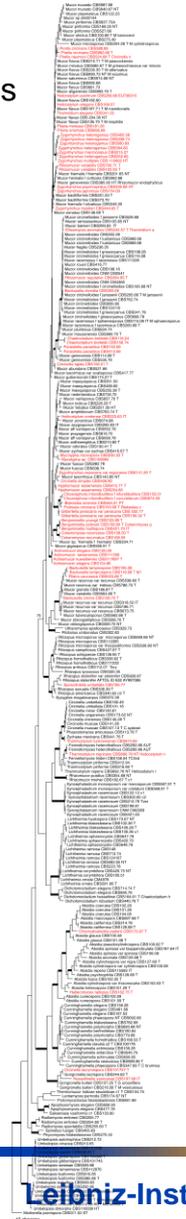
## D1/D2 Region der LSU

- ca. 280 LSU-Sequenzen, repräsentieren die molekulare Diversität der Mucorales (CBS)
- Molecular Taxonomic Units (=MOTUs) definiert durch ITS-Ähnlichkeiten  $\geq 99\%$

Walther et al., *Persoonia* 2013

# DNA Barcoding in Mucorales

LSU  
280 MOTUs  
RAxML



## *Mucor*



inkl.  
*Zygorhynchus*,  
*Circinella* p.p.,  
*Rhizomucor* p.p.,  
*Parasitella*,

Viele Sporangien-  
bildende Arten: *Backusella*,  
*Pirella*, *Thamnidium*,  
*Helicostylum*, *Ellisomyces*

*Rhizopus*

*Circinella* p.p.

*Syncephalastrum*

*Lichtheimia*

*Absidia*

*Cunninghamella*

*Umbelopsis*



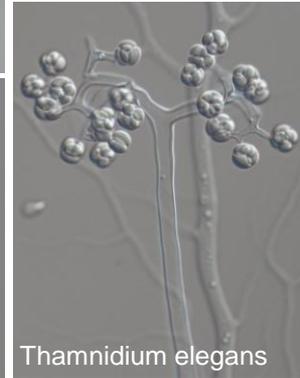
*Ellisomyces anomalus*



*Backusella ctenidia*



*Mycotypha microspora*



*Thamnidium elegans*



*Pirella circinans*



*Pirella circinans*

# DNA Barcoding in Mucorales: Die Aufspaltung der Gattung *Rhizomucor*

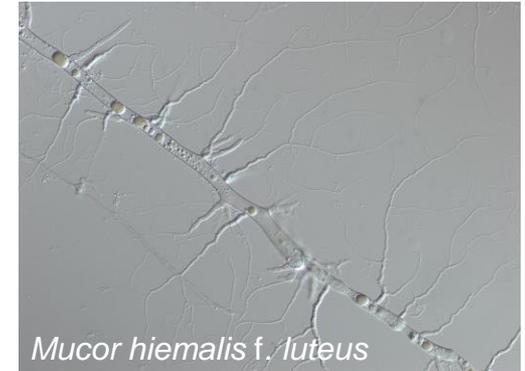
LSU  
280 MOTUs  
RAxML



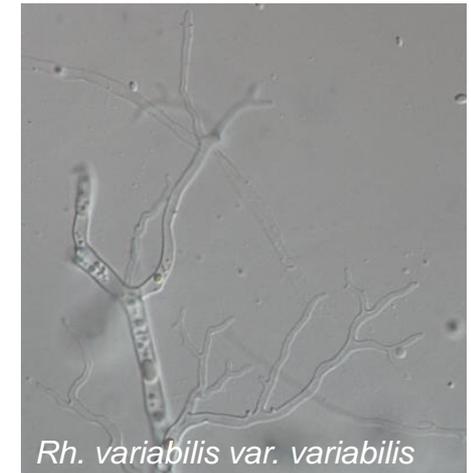
*Mucor irregularis*  
= *Rhizomucor variabilis* var. *variabilis*  
'*Rhizomucor*' *endophyticus*  
=? forma von *Mucor hiemalis*  
*Mucor circinelloides*  
= *Rhizomucor regularior*

- thermotolerant
- ellipsoide Sporen

***Rhizomucor***  
• thermophil  
• runde Sporangiosporen  
• nur *Rm. pusillus* und *Rm. miehei*



*Mucor hiemalis* f. *luteus*

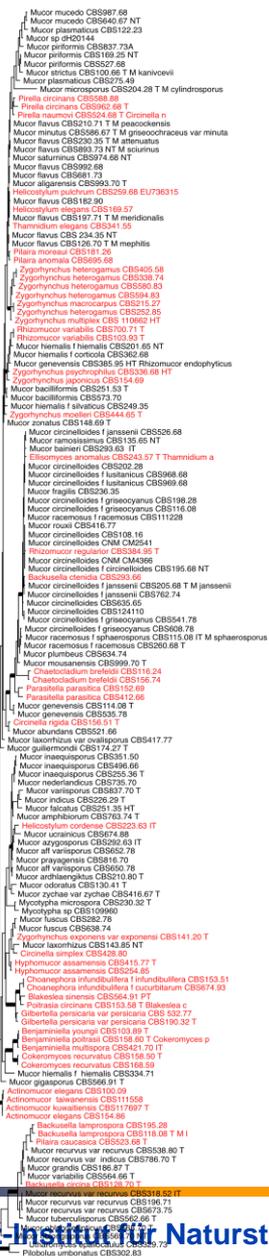


*Rh. variabilis* var. *variabilis*

Walther et al., *Persoonia* 2013

# DNA Barcoding in Mucorales: Subklassifizierung von *Mucor*

Oberer Teil  
des LSU Baums  
RAxML



*M. mucedo* group

*M. flavus* group

*M. hiemalis* group

*M. circinelloides* group

*M. indicus* group

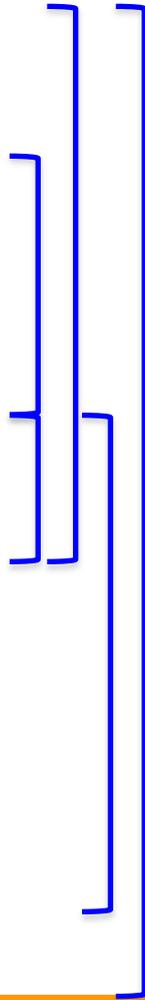
*M. recurvus* group

# DNA Barcoding in Mucorales: Die *Mucor circinelloides* Gruppe



ITS,  
135 taxa,  
RAxML

Mucor circinelloides f. circinelloides CBS195.68 NT  
Mucor circinelloides f. circinelloides CBS247.35  
Mucor circinelloides f. circinelloides CNM CM2922  
Mucor circinelloides f. circinelloides IHEM16415  
Mucor circinelloides f. circinelloides CBS480.70G  
Mucor circinelloides f. circinelloides CNM CM4621  
Mucor circinelloides f. circinelloides CNM CM5166  
Mucor circinelloides f. circinelloides CBS196.68  
Mucor circinelloides f. circinelloides CBS394.68  
Mucor circinelloides f. circinelloides CBS172.27  
Mucor circinelloides f. circinelloides CBS194.68  
Mucor sp. circinelloides f. circinelloides CBS121702  
Rhizomucor variabilis var. regularior IHEM21426  
Rhizomucor variabilis var. regularior IHEM20006  
Rhizomucor variabilis var. regularior IHEM21105  
Rhizomucor variabilis var. regularior CBS384.95 T  
Rhizomucor variabilis var. regularior CNM CM2437  
Rhizomucor variabilis var. regularior IHEM22323  
Rhizomucor variabilis var. regularior CNM CM4249  
Rhizomucor variabilis var. regularior CNM CM5071  
Rhizomucor variabilis var. regularior CBS239.35 T M griseoosus  
Rhizomucor variabilis var. regularior CBS111555  
Mucor rouxii CBS416.77  
Mucor circinelloides CBS479.70  
Mucor circinelloides CBS123973  
Mucor circinelloides CBS111560  
Mucor circinelloides CBS480.70F  
Mucor circinelloides CBS108.16  
Mucor circinelloides IHEM21158  
Mucor circinelloides CBS295.34  
Mucor circinelloides CNM CM4569  
Mucor circinelloides CNM CM4895  
Mucor circinelloides CNM CM4974  
Mucor circinelloides CNM CM3926  
Mucor circinelloides CNM CM2541  
Mucor circinelloides CNM CM3178  
Mucor circinelloides CNM CM3785  
Mucor circinelloides CNM CM4299  
Mucor circinelloides CNM CM3510  
Mucor circinelloides CBS1392.68  
Mucor circinelloides CNM CM4366  
Mucor circinelloides CNM CM3112  
Mucor circinelloides CNM CM4526  
**Backusella ctenidia CBS293.66**  
**Backusella ctenidia CBS696.76**  
**Backusella ctenidia CBS433.87**  
Mucor circinelloides f. griseocyaneus CBS223.56  
Mucor circinelloides f. griseocyaneus CBS366.70  
Mucor circinelloides f. griseocyaneus CBS698.68  
Mucor circinelloides f. griseocyaneus CBS198.28  
Mucor circinelloides f. griseocyaneus CBS116.08  
Mucor sp. circinelloides CBS846.73  
Mucor sp. circinelloides f. janssenii CBS526.68  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS108.17  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS633.65  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS968.68  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS847.72  
- Mucor ramosissimus CBS135.65 NT  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS111229 c2  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS851.71  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS276.49  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS969.68  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS253.35  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS242.33  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS111229 c4  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS111228 c3  
Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS111228 c1  
Mucor fragilis CBS296.35  
Mucor circinelloides CBS338.71  
Mucor circinelloides CNM CM5225  
Mucor circinelloides CBS635.65  
**Ellisomyces anomalus CBS243.57 T Thamnidium a**  
**Ellisomyces anomalus CBS697.76**  
Mucor circinelloides CBS202.28  
Mucor bainieri CBS293.63 IT  
Mucor circinelloides CBS124110  
Mucor circinelloides f. janssenii CBS232.29 T M tenellus  
Mucor circinelloides f. janssenii CBS365.70  
Mucor circinelloides f. janssenii CBS185.68 T M kurssanovii  
Mucor circinelloides f. janssenii CBS206.68  
Mucor circinelloides f. janssenii CBS227.29  
Mucor circinelloides f. janssenii CBS243.67  
Mucor circinelloides f. janssenii CBS205.68 T M janssenii  
Mucor circinelloides f. janssenii CBS762.74  
Mucor sp. circinelloides f. janssenii CBS144.93  
Mucor sp. circinelloides f. janssenii CBS204.66  
Mucor sp. circinelloides f. janssenii CBS204.66



*M. circinelloides* f. *circinelloides*

'*Rhizomucor regularior*'

*M. circinelloides* f. ?

***Backusella ctenidia***

*M. circinelloides* f. *griseocyaneus*

*M. circinelloides* f. *lusitanicus*  
= *M. lusitanicus*

***Ellisomyces anomalus***

*M. circinelloides* f. *janssenii*



Backusella ctenidia



Ellisomyc. anomalus



Prof. Dr. Oliver Kurzai (Leiter des NRZMyks)

Email: [oliver.kurzai@hki-jena.de](mailto:oliver.kurzai@hki-jena.de)

Tel.: 03641 532-1551



Prof. Dr. Oliver Kurzai  
FA Mikrobiologie  
Schriftführer DMykG, *EIC Medical Mycology Case Reports*  
ISHAM Executive Board, CSCC Executive Board



PD Dr. Kerstin Voigt  
Leiterin der *Jena Microbial Ressource Collection*  
Expertin und Verfasserin von Standardwerken  
im Bereich mykologische Taxonomie,  
Gastdozentin des CBS



Prof. Dr. Marie v. Lilienfeld-Toal  
FA Innere Medizin, Hämatologie  
Professur für Infektionsforschung  
in der Hämato-Onkologie  
klinischer Schwerpunkt Febrile Neutropenie

# NRZMyk@HKI