TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
KLINIK UND POLIKLINIK FÜR DERMATOLOGIE UND ALLERGOLOGIE
AM BIEDERSTEIN

Ringversuch "Innenraum- und Lebensmittel- relevante Schimmelpilze" des Landesgesundheitsamts Baden-Württemberg im Regierungspräsidium Stuttgart

H.P. Seidl, T. Gabrio, U. Weidner, I. Dill, T. van Doorn, G. Fischer, E. Hoekstra, I. Ilyashenko, S. Janich-Grün, R. Rabe, R.A. Samson, R. Szewzyk, C. Trautmann

Ringversuch Differenzierung von Schimmelpilzen im Innenraum und in Lebensmitteln

- etabliert 2001 vom Regierungspräsidium Stuttgart, Landesgesundheitsamt, im Auftrag des Umweltbundesamtes
- Vier von sechs Reinkulturen müssen nach Gattung und Art richtig identifiziert werden
- Die Proben müssen innerhalb von sechs Wochen bearbeitet werden
- Die selbständige Durchführung muss bestätigt werden
- Die Arbeitserlaubnis der zuständigen Behörde gemäß §§ 44 ff. Infektionsschutzgesetz vom 20. Juli 2000 muss vorliegen

Interne Qualitätskontrolle durch Referenzlabore

Prüfung der Kulturen bezüglich

- der Eindeutigkeit der morphologischen Ausprägung
- der Reinheit
- des Schwierigkeitsgrades
- der Relevanz für den Innenraum / in Lebensmitteln
- des optimalen Nährmediums

Referenzlabore (alphabetisch)

- Dr. Dill, Dr. Trautmann, Berlin
- Dr. Gabrio / Dr. Fischer, U. Weidner, Stuttgart
- Dr. Grün, Köln
- Dr. Rabe, Essen
- Dr. Samson, T. van Doorn, Utrecht
- Dr. Seidl, München, externer wissenschaftlicher Koordinator

erhalten die Stämme anonym

Auswahl der Kulturen zum Versand

- aus 20 Stämmen bei RV 1
- aus 24 Stämmen bei RV 2
- aus 26 Stämmen bei RV 3
- aus 20 Stämmen bei RV 4
- aus 22 Stämmen bei RV 5
- aus 22 Stämmen bei RV 6
- aus 25 Stämmen bei RV 7
- aus 21 Stämmen bei RV 8
- aus 19 Stämmen bei RV 9
- aus 19 Stämmen bei RV 10
- aus 22 Stämmen bei RV 11
- aus 7 Stämmen bei RV 12
- aus 7 Stämmen bei RV 13
- aus 43 Stämmen bei RV 14
- aus 6 Stämmen bei RV 15
- aus 20 Stämmen bei RV 16
- aus 22 Stämmen bei RV 17
- aus 20 Stämmen bei RV 18

- Ab dem 3. Ringversuch basierte die Auswahl auf Wildstämmen, die von den Referenzlaboren zur Verfügung gestellt wurden

- Die zum Versand gelangenden Ringversuchsproben werden durch die Referenzlabore zur Reinheitskontrolle nochmals parallel geprüft

Mögliche Beispiele für Ringversuchsproben

blau = Stamm wurde bereits ausgesandt

Absidia corymbifera	A. restrictus (4x)	Byssochlamys nivea	Engyodontium album
Acremonium kiliense	A. sydowii (3x)	Chaetomium globosum (3x)	Epicoccum nigrum
Acr. murorum (2x)	A. tamarii	Chrysonilia sitophila	Eurotium amstelodami (2x)
Acr. strictum	A. terreus	Chrysosporium sp.	E. chevalieri
Alternaria alternata	A. ustus	Cladosporium cladosporioides	E. herbarum
Aspergillus candidus (2x)	A. versicolor (2x)	Cl. herbarum	E. rubrum
A. fumigatus (2x)	A. wentii	Cl. sphaerospermum (2x)	Fusarium culmorum
A. niger	Aureobasidium pullulans (3x)	Curvularia geniculata	F. oxysporum
A. ochraceus (2x)	Beauveria bassiana	Doratomyces sp. / Trichurus sp.	F. solani
A. penicillioides (2x)	Botrytis cinerea	Emericella nidulans (2x)	Geomyces pannorum (2x)

Mögliche Beispiele für Ringversuchsproben

blau = Stamm wurde bereits ausgesandt

Gliocladium roseum	P. chrysogenum (3x)	P. purpurogenum	Stachybotrys chartarum
Hefen	P. citrinum	P. roqueforti	Stemphylium botryosum
Memnoniella echinata	P. commune (2x)	P. variabile	Syncephalastrum racemosum (2x)
Mucor hiemalis	P. corylophilum	Phialophora fastigiata	Trichoderma harzianum
M. plumbeus (2x)	P. digitatum (4x)	Phoma glomerata (2x)	T. viride
M. racemosus	P. expansum (3x)	Ph. macrostoma	Trichothecium roseum
Oidiodendron griseum	P. funiculosum	Rhizopus stolonifer (2x)	Ulocladium chartarum
Paecilomyces variotii (2x)	P. glabrum (2x)	Rhodotorula minuta	Verticillium lecanii
Penicillium aurantiogriseum	P. griseofulvum	Scopulariopsis brevicaulis (2x)	V. luteoalbum
P. brevicompactum	P. olsonii (2x)	S. fusca (2x)	Wallemia sebi (2x)

Auch mit nicht aufgeführten Stämmen ist zu rechnen !

z.B.

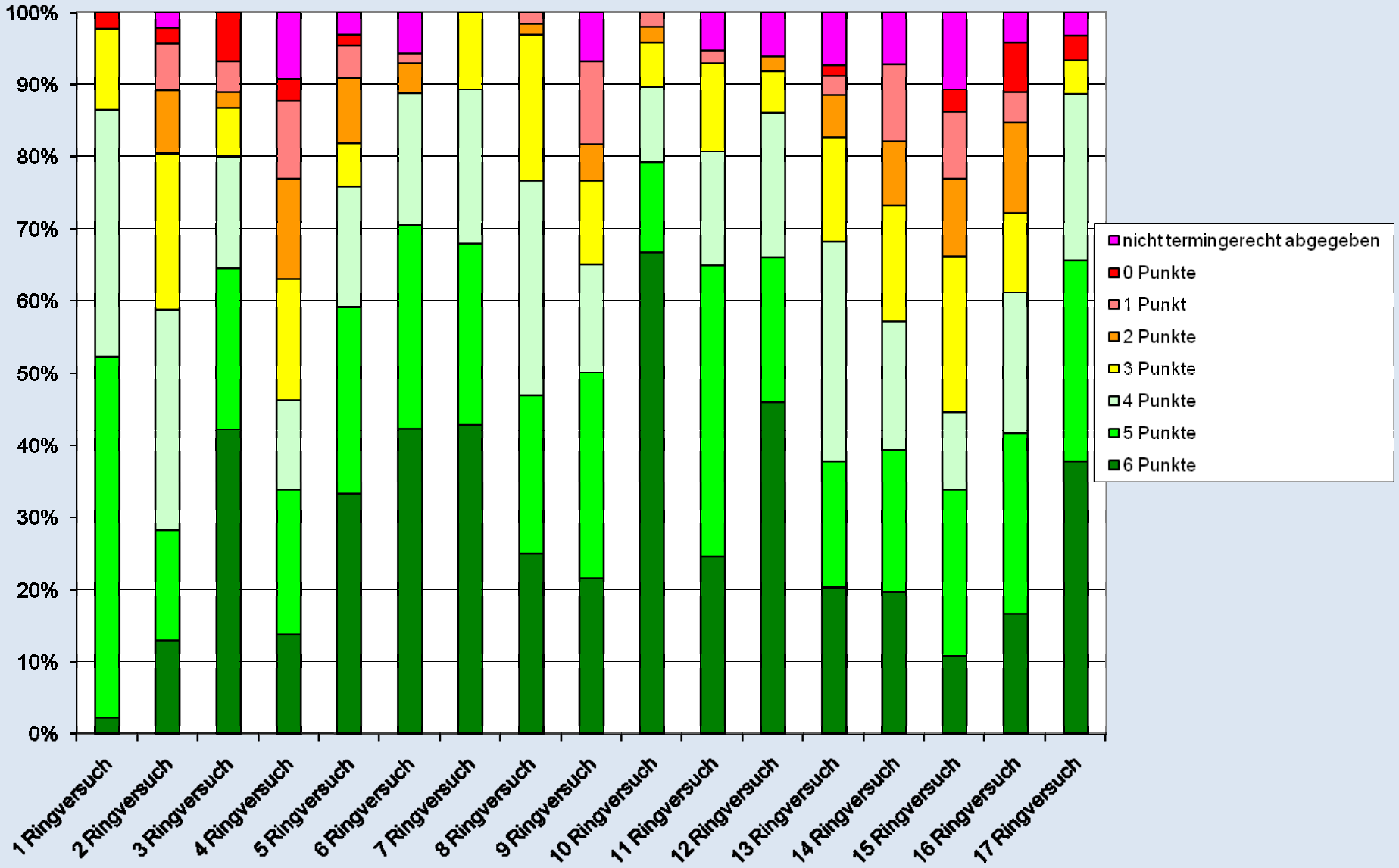
- Candida albicans (6.RV)
- Geotrichum candidum (8. und 12. RV)
- Paecilomyces lilacinus (9., 12. und 15. RV)
- Penicillium decumbens (14. RV)

z.B.

- Penicillium italicum (16. RV)
- Penicillium rugulosum (7. und 15. RV)
- Trichoderma longibrachiatum (14. RV)
- Tritirachium oryzae (16. RV)

Ergebnisse

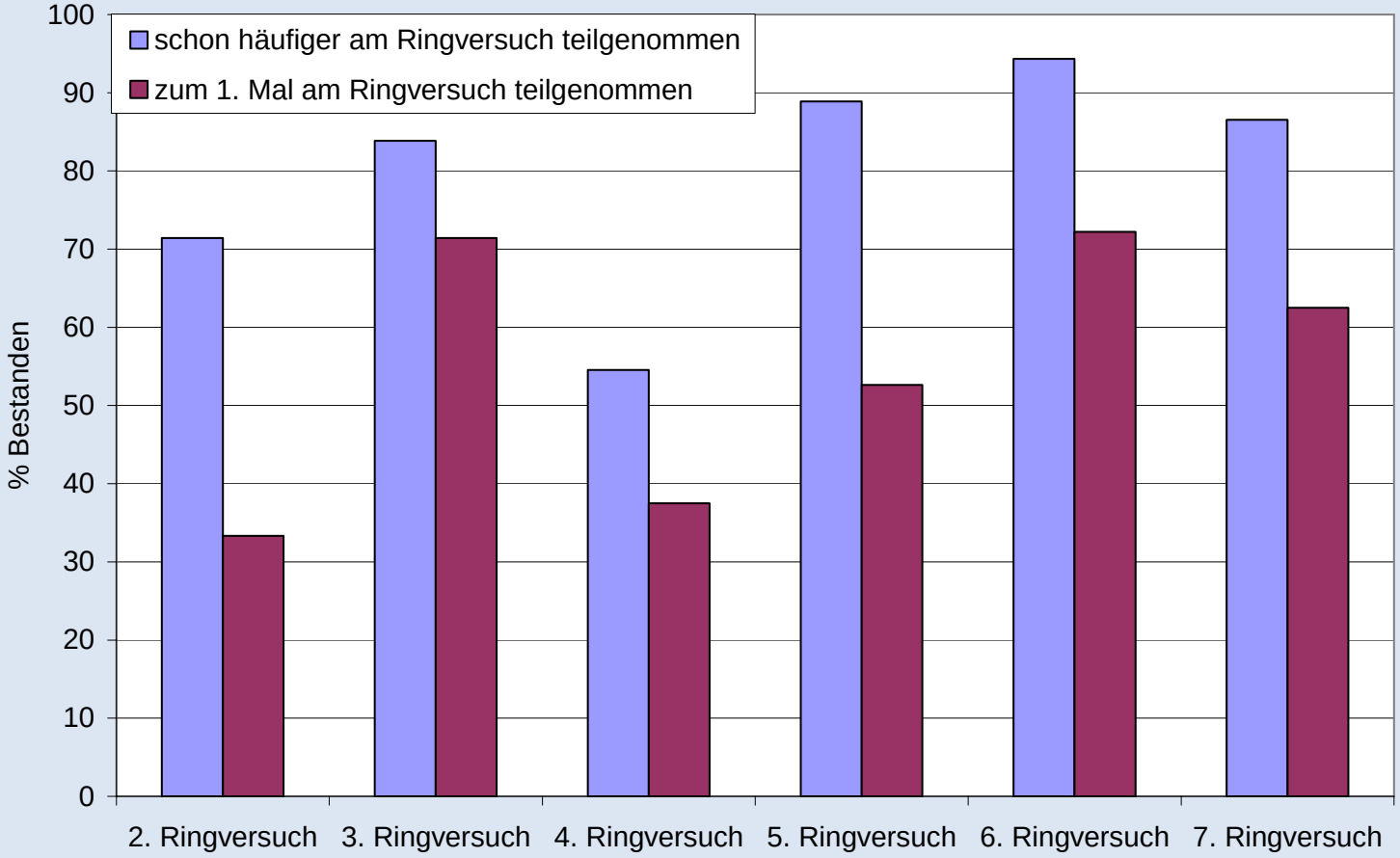
- Beginn des Ringversuchs im Herbst 2001
- Bisher wurden 17 Ringversuche durchgeführt
- Der Ringversuch 18 ist derzeit in Vorbereitung
- Beteiligung jeweils zwischen 44 und 77 Laboratorien
- Teilnehmende Labore auch aus Belgien, Finnland, den Niederlanden, Österreich, Portugal, Schweden, der Schweiz, der Slowakei und Ungarn


100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
1 Ringversuch
2 Ringversuch
3 Ringversuch
4 Ringversuch
5 Ringversuch
6 Ringversuch
7 Ringversuch
8 Ringversuch
9 Ringversuch
10 Ringversuch
11 Ringversuch
12 Ringversuch
13 Ringversuch
14 Ringversuch
15 Ringversuch
16 Ringversuch
17 Ringversuch
nicht termingerecht abgegeben
0 Punkte
1 Punkt
2 Punkte
3 Punkte
4 Punkte
5 Punkte
6 Punkte

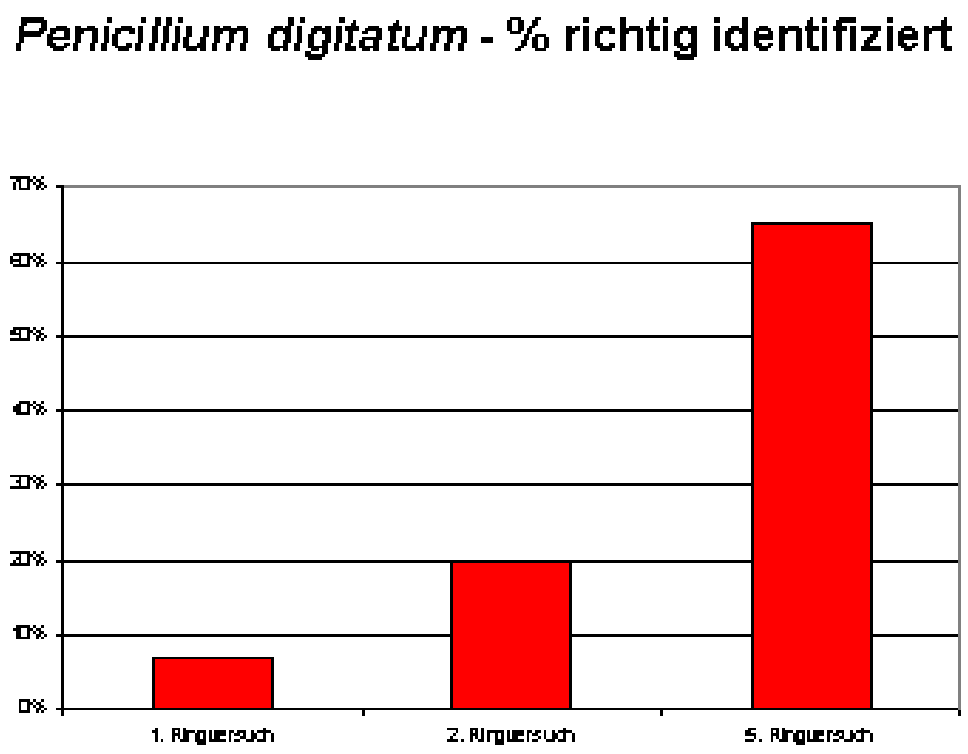
Die Ergebnisse in Zahlen

Anzahl teilnehmende Labore / bestanden (%)			
1. RV: 44 / 86.4%	5. RV: 66/ 76.0 %	9. RV: 67 / 69.6 %	13. RV: 64 / 73.4 %
2. RV: 46 / 58.7 %	6. RV : 62 / 87.7 %	10. RV: 47 / 89.4 %	14. RV: 64 / 57.6 %
3. RV: 45 / 80.0 %	7. RV: 69 / 82.0 %	11. RV: 57 / 85.2 %	15. RV: 58 / 44.0 %
4. RV: 65 / 46.2 %	8. RV: 77 / 76.6 %	12. RV: 47 / 91.5 %	16. RV: 69 / 58.0 %
17. RV: 61 / 89 %			

Der Schulungseffekt von Ringversuchen



Der Schulungseffekt von Ringversuchen



Erfolgreiche Identifizierung der Reinkulturen

16. Ringversuch

- Engyodontium album (54 %)
- Eurotium chevalieri (64 %)
- Penicillium italicum (45 %)
- Tritirachium oryzae (56 %)
- Geomyces pannorum (80 %)
- Cladosporium herbarum (55 %)

17. Ringversuch

- **Aspergillus candidus** (92 %)
- **Mucor hiemalis** (67 %)
- **Penicillium camemberti** (90 %)
- **Oidiodendron griseum** (75 %)
- **Wallemia sebi** (93 %)
- **Penicillium citreonigrum** (54 %)

Fehlnennungen im 16. Ringversuch

statt Engyodontium album

- Acremonium charticola (6)
- Acremonium murorum (2)
- Acremonium sp.
- Acremonium spinosum (5)
- Acremonium strictum (2)
- Beauveria album (1)
- Beauveria bassiana (3)
- Beauveria sp. (1)
- Engyodontium sp. (1)
- Eurotium rubrum (1)
- Lecanicillium fusisporum (1)
- Moniella acetoabutens (1)
- Tritirachium album (1)
- Tritirachium roseum (1)

statt Tritirachium oryzae

- Acremonium charticola (2)
- Acremonium potronii (2)
- Acremonium roseogriseum (1)
- Acremonium rutilum (1)
- Acremonium strictum (3)
- Beauveria bassiana (1)
- Chrysosporium pannorum (1)
- Fusarium subglutinans (1)
- Paecilomyces marquandii (3)
- Sporobolomyces sp. (1)
- Tritirachium roseum (1)
- Tritirachium sp. (3)
- Tritirachium roseum (1)
- Verticillium lecanii (2)
- Verticillium tenerum (1)
- Wallemia sebi (1)

Fehlnennungen im 17. Ringversuch

statt Oidiodendron griseum

- Amorphotheca resinae (1)
- Cladosporium herbarum (1)
- Exophiala sp. (1)
- Geomyces pannorum (1)
- Geotrichum candidum (1)
- Moniliella suaveolens (1)
- Oidiodendron sp. (2)
- Phialophora cyclaminis (1)
- Phialophora fastigiata (1)
- Streptomyces spp. (1)
- Trichophyton tonsurans (1)

statt Penicillium citreonigrum

- Paecilomyces spp. (1)
- Paecilomyces viridis (2)
- Penicilium citrinum (1)
- Penicillium canescens (1)
- Penicillium chrysogenum (3)
- Penicillium citrinum (2)
- Penicillium corylophilum (2)
- Penicillium decumbens (4)
- Penicillium fellutanum (1)
- Penicillium glabrum (7)
- Penicillium griseoroseum (1)
- Penicillium spinulosum (1)
- Penicillium spp. (1)

Fehlnennungen bei der molekularbiologischen Identifizierung

- Fehlidentifizierung von *Eurotium chevalieri* als *Eurotium amstelodami* bei der Sequenzierung durch 1 Labor
- Fehlidentifizierung von *Penicillium italicum* als *Penicillium expansum* durch 2 Labore mittels PCR
- Fehlidentifizierung von *Cladosporium herbarum* als *Cladosporium macrocarpum* durch 2 Labore mittels PCR
- Fehlidentifizierung von *Tritirachium oryzae* als *Sporobolomyces sp.* durch 1 Labor mittels PCR!

Fehlnennungen bei der molekularbiologischen Identifizierung

- Fehlidentifizierung von *P. citreonigrum* als *P. chrysogenum* bei der Sequenzierung durch 1 Labor
- Fehlidentifizierung von *Mucor hiemalis* als *Mucor indicus* bei der Sequenzierung durch 1 Labor

- Identifizierung von *P. citreonigrum* als *P. toxicarium* bei der Sequenzierung durch 4 Labore

Austausch realer Proben

Bisher wurden versandt

- 2 Luftproben gesammelt auf Gelatinefiltern
- 1 Holzprobe
- 1 Mehlprobe
- 3 Luftproben gesammelt durch Impaktion
- 3 Staubproben
- 5 Mischkulturen
  lyophilisiert oder in Glycerin

Reale Proben

Die Ergebnisse aus den realen Proben zeigten

ausnahmslos enorme Unsicherheiten auf !

10. Ringversuch – Auswertung einer Staubprobe

Gattung/Art	**Ermittelte KBE/g im Staub**		
	Median	**Maximalwert**	**Zahl der Teilnehmer *ohne* Nachweis dieser Gattung/Art**
Alternaria spp.	9.000	160.000	10 von 38
Cladosporium spp.	23.000	140.000	6 von 38
Aspergillus flavus	0	10.000	29 von 38
Aspergillus fumigatus	0	9.000	22 von 38
Aspergillus niger	0	29.000	20 von 38
Aspergillus ochraceus	0	10.000	24 von 38
Aspergillus restrictus	0	80.000	34 von 38
Aspergillus versicolor	0	20.000	25 von 38
Penicillium chrysogenum	3.000	53.300	18 von 38
Hefen	33.300	140.000	13 von 38
Fusarium spp.	0	130.000	28 von 38
Mucor spp.	0	24.000	19 von 38
Stachybotrys chartarum	0	3.300	36 von 38
Wallemia sebi	0	31.666	25 von 38

10. Ringversuch – Auswertung einer Staubprobe
Schwierigkeiten auch bei den Referenzlaboren

Gattung/Art	Ermittelte KBE/g im Staub		
	Minimalwert	**Maximalwert**	**Nicht nachweisbar bei**
Alternaria spp.	0	50.000	2 Referenzlaboren
Cladosporium spp.	15.000	110.000	---
Hefen	7.000	130.000	---
Fusarium spp.	0	130.000	2 Referenzlaboren

Diskrepanzen bei der quantitativen Auswertung der Staubprobe – mögliche Ursachen

- Trotz Verwendung der < 63 µm Fraktion sind in der Staubprobe Inhomogenitäten nicht auszuschließen

- Eine Veränderung bzw. Abnahme der Keimzahlen während längerer Lagerung der Staubprobe ist ebenfalls nicht auszuschließen.

- Grundsätzlich sind auch Einflüsse möglich durch die Verwendung von Nährböden unterschiedlicher Hersteller.

12. Ringversuch – Luftprobe mit grenzwertiger Belastung durch *Stachybotrys chartarum*

Die aus den erhaltenen Ergebnissen abgeleiteten Bewertungen

- Eine Belastung ist unwahrscheinlich
- Eine Belastung ist nicht auszuschließen
- Eine Belastung ist wahrscheinlich

konnten im Einzelfall sämtlich richtig sein!

16. Ringversuch, reale Probe, Auszug aus den quantitativen Daten

	Teilnehmende Labore (53)			Referenzlabore (7)		
	A.fum	***A. sydowii***	***P. variotii***	***A.fum***	***A. sydowii***	***P. variotii***
Min.	**0**	**0**	**0**	**90**	**400**	**63**
Max.	**17.700**	**53.300**	**10.000**	**2.500**	**5.000**	**370**
Mittel-wert	**2.708**	**2.279**	**1.473**	**1.051**	**2.151**	**164**

Die Erkenntnis

Einige Labore hätte einem potentiellen

Auftraggeber als Gesamtkeimzahl 0 KBE mitgeteilt,

und damit keinerlei Belastung,

andere Labore dagegen Maximalwerte bis zu

10.000 / 17.700 / 53.300 KBE !

Lyophilisierte Mischkultur des 16. Ringversuchs

- Aspergillus fumigatus
  (erkannt von 80 % der Labore)
- Aspergillus sydowii
  (erkannt von 70 % der Labore)
- Paecilomyces variotii
  (erkannt von 85 % der Labore)

- 2 von 3 Stämmen mussten korrekt erkannt werden
  (erreicht von 90 % der Labore)

- Die Konzentration ging nicht in die Bewertung ein

Häufigste Fehler

- Kontaminationen

- Rechenfehler!!!

- Missachtung der VDI Richtlinie DIN 4300 Blatt 10 bei der Auswertung

- Falschidentifikationen

Mischkultur des 17. Ringversuchs

- **Aspergillus restrictus**
  (erkannt von 86 % der Labore)
- **Emericella nidulans/A. nidulans**
  (erkannt von 65 % der Labore)
- **Penicillium citrinum**
  (erkannt von 56 % der Labore)
- **Stachybotrys chartarum**
  (erkannt von 79 % der Labore)
- **Wallemia sebi**
  (erkannt von 77 % der Labore)

- 4 von 5 Stämmen mussten korrekt erkannt werden (erreicht von 69 % der Labore), die Konzentration ging nicht in die Bewertung ein

Häufigste Fehler

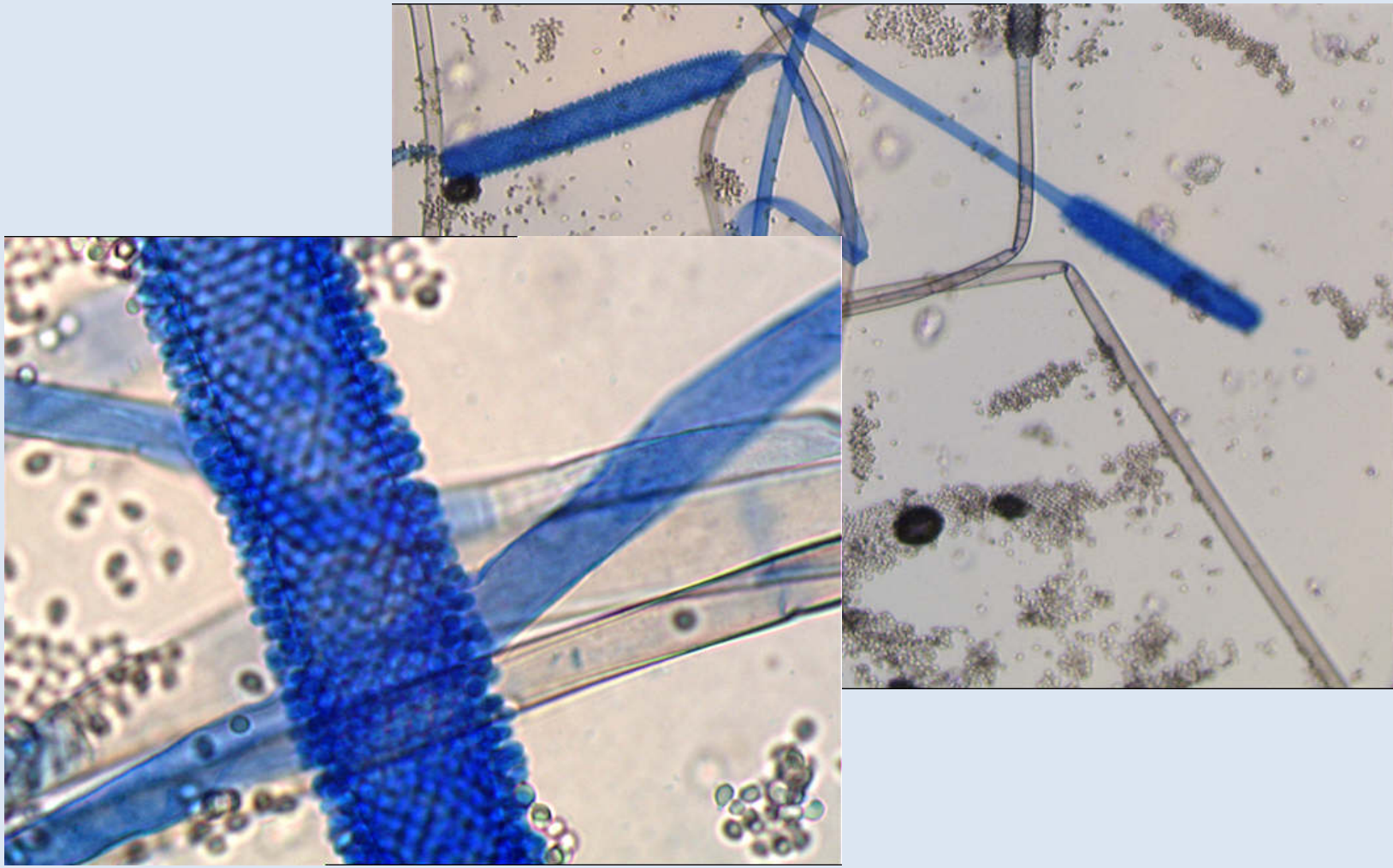
- Kontaminationen
- Rechenfehler!!!
- Missachtung der VDI Richtlinie DIN 4300 Blatt 10 bei der Auswertung
- Falschidentifikationen

Die telepathische Verbundenheit zweier Labore

Spezies	DG 18, unverdünnt			MEA, unverdünnt		
	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3
A. restrictus Lab A	22	34	12			
A. restrictus Lab B	21	30	11			
A. ustus Lab	244	211	208			
A. ustus Lab	242	215	210			
P. citrinum Lab				60	17	34
P. citrinum Lab				58	19	33
Stachybotr. Lab				122	119	131
Stachybotr. Lab B				118	121	133

Die weitere telepathische Verbundenheit dieser Labore

- übereinstimmende Falschangabe von *A. ustus* statt *Emericella nidulans* / *A. nidulans*
- beide übereinstimmend mit der Keimzahl von 1980 KBE/m³
- übereinstimmende Auswertung von *P. citrinum* auf MEA
- übereinstimmende Angabe der Falschkombination

  „*Acremonium roseogriseum* – *Paecilomyces javanicus* – *Penicillium variabile*“ im 15. RV

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit !