



Exogen allergische Alveolitis (EAA) durch den Erreger der Rußrindenkrankheit (*Cryptostroma corticale*) – Eine diagnostische Herausforderung

Herstellung und Validierung von diagnostischen Testtools am IPA



Sabine Kespohl, Jörg Grüner, Rasmus Enderle,
Janett Riebesehl, Monika Raulf

*Klimatische Veränderungen führten in den letzten Jahren in Deutschland zu einem verstärkten Befall von Ahornbäumen mit der sogenannten Rußrindenkrankheit. Die Sporen dieses Pilzes können bei Beschäftigten, die mit befallenen Holz in Kontakt kommen, zu einer exogen allergischen Alveolitis führen. In Zusammenarbeit mit verschiedenen Unfallversicherungsträgern und Forschungsinstituten hat das IPA diagnostische Tools zum Nachweis von *Cryptostroma corticale* Sporen- und Myzelantigenen entwickelt.*

Seit etwa 2017 wird vermehrt das Auftreten der Rußrindenkrankheit bei Ahornbäumen in Deutschland nachgewiesen. Diese Baumkrankheit wird durch den Pilz *Cryptostroma corticale* (*C. corticale*) ausgelöst (Grüner et al. 2020, Enderle et al. 2020). Durch eine Infektion des Pilzes in der Rinde und im Holz kommt es letztendlich zu einem

vermehrten und beschleunigten Absterben geschwächter Ahornbäume. In Deutschland ist der Bergahorn die hauptsächlich von der Krankheit betroffene Baumart, daneben dienen aber Spitz-, Feld- oder auch Silberahorn als potentielle Wirte für den Pilz. Ursprünglich aus Nordamerika stammend, verbreitet sich *C. corticale* in Europa

seit Mitte der 1940er Jahre. Bei geschwächten Bäumen zeigt der Pilz seine verheerende Wirkung: flächig unter der Rinde hervorbrechende schwarze Sporenlager werden sichtbar (Abb. 1). Der Trockenstress in den letzten Jahren, gepaart mit großer Hitze, verursachten in vielen Ahorn-Beständen derartige Schädigungen und veränderten so das Waldbild. Eine durch den Pilz verursachte Weißfäule, zusammen mit auffälligen, grünlich-grauen Verfärbungen im Stamm, machen das Holz für die Weiterverarbeitung unbrauchbar.

Rußrindenkrankheit für exponierte Beschäftigte ein gesundheitliches Risiko

Befallene Ahornbäume können unter ihrer Rinde großflächig angelegte Sporenmengen von bis zu 170 Mio. Sporen/cm² aufweisen. Werden sie gefällt, so kann es durch Einatmen der Sporen bei Beschäftigten zu schweren Entzündungsreaktionen, begleitet von Lungen- und Atemwegssymptomen, kommen. Aber auch in Holzverarbeitenden Betrieben wie Papierfabriken und Sägewerken wurde die durch *C. corticale* induzierte Erkrankung als ‚Wood pulp workers disease‘ beschrieben (Wenzel & Emanuel 1967). Eine häufige und intensive Exposition gegen *C. corticale* kann bei exponierten Beschäftigten eine exogene allergische Alveolitis (EAA) verursachen. Hierzu existieren verschiedene klinische Fallbeschreibungen (Emanuel et al. 1966; Tewksbury et al. 1968, Shepherd et al. 1989) und die zunehmende Bedeutung dieser Thematik wurde in einem aktuellen Übersichtsartikel (Braun et al.

Kurz gefasst

In Deutschland kommt es zu einem vermehrten Befall der Ahornbäume durch den Pilz der Rußrindenkrankheit *Cryptostroma corticale*.

Die Sporen von *C. corticale* können bei exponierten Beschäftigten eine exogene allergische Alveolitis (EAA), eine seltene interstitielle Lungenerkrankung, auslösen.

Die am IPA entwickelten validierten Antigen-Testtools zur serologischen Bestimmung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen *C. corticale* und die Etablierung von Referenzwerten können zukünftig die Diagnostik bei Verdachtsfällen auf EAA durch *C. corticale* verbessern.

2021) zusammengestellt. Bei der EAA handelt es sich um eine seltene interstitielle Lungenerkrankung, die auch als Berufskrankheit anerkannt werden kann (BK-Nr. 4201).

Ende 2019 beschäftigte sich auch der Arbeitskreis Abfallwirtschaft im Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS-UA2) angesichts der massiven Fällungen und Beseitigungen der durch *C. corticale* geschädigten Ahornbäume in städtischen Bereichen mit den potenziellen gesundheitlichen Risiken für exponierte Beschäftigte. Betroffen sind unter anderem versicherte Personen der BG Verkehr beim Transport und der separaten Zerkleinerung des Holzes. Da diese Thematik und insbesondere

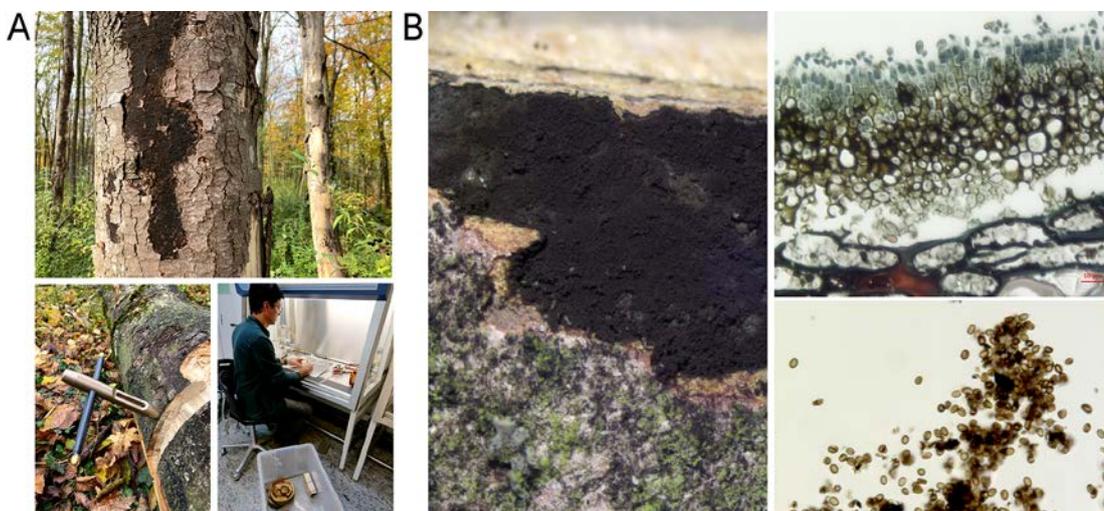


Abb. 1 Jeweils im Uhrzeigersinn: A) Schimmelpilz *C. corticale* unter der Rinde des Ahorn, Probennahme an befallenen Ahorn-Stamm und Aufarbeitung der Pilzproben unter der Sterilbank; B) schwarze freiliegende Sporenlager von *C. corticale* in der Rinde, mikroskopische Aufnahme (Querschnitt) der sporenbildenden Schicht von *C. corticale* in der äußeren Rinde von Bergahorn, pigmentierte ovale Sporen von *C. corticale* (5 x 4 µm).



die Aufklärung der gesundheitlichen Risiken inklusive einer spezifischen Diagnostik bei Erkrankungsverdachtsfällen auch für weitere Unfallversicherungsträger von Interesse ist, wurde *C. corticale* als Forschungsthema in das laufende „IPA-Projekt 145-Bioaerosole“ aufgenommen.

Spezifischer IgG-Nachweis als ein Baustein der EAA-Diagnostik

Die EAA ist eine seltene interstitielle Lungenerkrankung, die auf einer verzögerten allergischen Reaktion (Typ III/IV) in der Lunge basiert und häufig durch wiederholte, hohe Expositionen gegenüber mikrobiellen Antigenen in Stäuben oder Aerosolen induziert werden kann (Eisenhawer & Raulf, 2020). Obwohl *C. corticale* als potenzieller Auslöser einer EAA bei exponierten Beschäftigten in der Forstwirtschaft sowie in holzverarbeitenden Betrieben, Papierfabriken und Sägewerken bekannt ist, stehen bisher keine validierten Testmöglichkeiten zur Verfügung. Somit fehlt der serologische IgG-Antikörpernachweis gegen *C. corticale* als ein wichtiger Baustein in der Diagnostik der EAA. Um diese diagnostische Lücke zu schließen, wurden am IPA Tools zum Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern bei Verdacht auf eine EAA durch *C. corticale* entwickelt und etabliert. Für eine Bewertung der spezifischen IgG-Daten sind Referenzwerte (sogenannte Cut-off-Werte) erforderlich. Nur so kann abgeschätzt werden, was dem „Normalbereich“ bei gesunden Probanden entspricht und ab welcher Konzentration die spezifischen IgG-Antikörper einen weiteren Hinweis auf eine EAA darstellen (Raulf et al. 2019).

Im Gegensatz zum spezifischen IgE sind die Referenzwerte (Cut-off) für verschiedene IgG-Antigene nicht einheitlich, sondern variieren je nach Antigen. Um diesen Referenzwert für *C. corticale* festlegen zu können, sollten Seren

Info

Ahornbäume

Ahornbäume sind sehr häufig anzutreffende Laubgehölze in Wäldern und im urbanen Grün.

Bergahorn ist eine Mischbaumart mit wichtigen ökologischen Funktionen.

Ahornholz hat wertvolle Holzeigenschaften, die sich nicht zuletzt auch in den Holzpreisen widerspiegeln.

Probleme, die sich für die Baumart ergeben, stellen also auch die Waldwirtschaft vor eine große Herausforderung.

von gesunden, nicht-exponierten und auch Seren von gesunden, exponierten Probanden untersucht werden. Um insbesondere Seren von exponierten Personen gewinnen zu können, wurde das Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität eingeholt (Registrier-Nr.: 20-7129). Mit Unterstützung der Sozialversicherung für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau (SVLFG) und weiterer Unfallversicherungsträger wurden gesunde, exponierte Beschäftigten rekrutiert, wobei zusätzlich zum Serum Daten zur Exposition und möglichen Beschwerden durch *C. corticale* mittels Fragebogen erhoben wurden.

Herstellung von Testantigenen

Im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation mit dem Julius Kühn-Institut (JKI) in Braunschweig sowie der Forstlichen Versuchs- und Forschungsanstalt Baden-Württemberg (FVA) konnte Ausgangsmaterial für die Herstellung valider Antigen-Testtools zur Verfügung gestellt

Info

Cryptostroma corticale

Aufgrund des gehäuften Auftretens von *C. corticale* wurde im Rahmen der Aktualisierung (04/2020) der Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 460 der Pilz *C. corticale* in die Risikogruppe I für Pilze eingestuft. Weiterhin erhielt *C. corticale* die Zusätze ‚A‘, für mögliche

allergene Wirkung beim Menschen (eine Typ III/IV allergische Reaktion als immunologische Basis der EAA) und ‚p‘ für pathogene Wirkung bei Pflanzen.

→ <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-460.html>

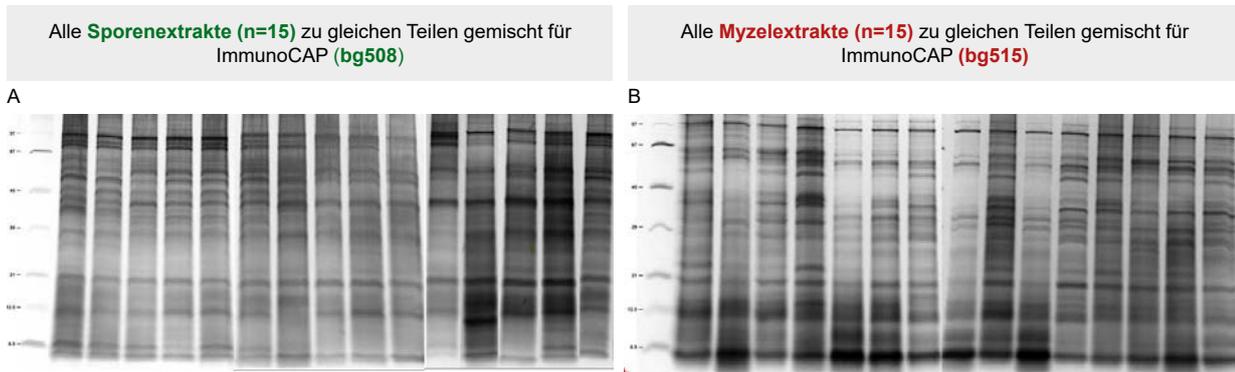


Abb. 2 SDS-Silbergele der einzelnen Sporenextrakte (A) und Myzelextrakte (B) von *C. corticale* für die Herstellung von IgG-Testtools.

werden (Abb. 1 A/B). Dabei handelte es sich um insgesamt 15 verschiedene *C. corticale* Stämme aus Proben, die in unterschiedlichen Regionen Deutschlands gesammelt wurden. Die Pilzmaterialproben (Abb. 1A) wurden von den Kooperationspartnern kultiviert, Myzel und Sporen nachfolgend präpariert, mikroskopisch identifiziert (Abb. 1B) und genetisch sequenziert. Das geprüfte Sporen- und Myzelmaterial von *C. corticale* wurde anschließend im IPA aufgearbeitet und extrahiert. Die Qualitätsprüfung der Extrakte erfolgte durch biochemische Analysen, die für eine validierte Entwicklung von Testtools nötig sind. Die extrahierten Proteine aus Pilzsporen und Pilzmyzel wurden mittels Silberfärbung im SDS-Gel analysiert (Abb. 2). Die Proteinbanden der Sporen- beziehungsweise Myzelextrakte lagen im Molekulargewichtsbereich von 5 bis 100 kDa. Die qualitativen Proteinmuster sind innerhalb der Sporen bzw. Myzelien in den verschiedenen Stämmen vergleichbar. Von den 15 verschiedenen Stämmen von *C. corticale* wurden jeweils die Sporen- (Abb. 2A) und Myzelextrakte

(Abb. 2B) gepoolt. Die enthaltenen Proteine/Antigene wurden nachfolgend biotinyliert und an Streptavidin-ImmunoCAPs gekoppelt.

Bedeutung von Referenzwerten

Um die spezifische IgG-Antikörperkonzentration in einem nicht exponierten Kollektiv als Referenzwertbereich von unbelasteten Personen zu bestimmen, wurden 20 Seren aus der Referenzwertstudie randomisiert ausgewählt und getestet (Raulf et al. 2019). Ebenso standen durch die Unterstützung der SVLFG und anderer Unfallversicherungsträger 17 Seren von exponierten, aber nicht erkrankten Beschäftigten zur Verfügung. Die Charakteristika der beiden Untersuchungskollektive sind in Tab. 1 dargestellt. Beide Referenzkollektive, mit und ohne Exposition gegen *C. corticale*, waren hinsichtlich Alter, Geschlecht und Raucherstatus vergleichbar. In diesen insgesamt 37

	Referenzkollektiv OHNE Exposition (n=20)	Referenzkollektiv MIT Exposition (n=17)
Alter: Median [Min-Max]	44 J [22 J – 62 J]	47 J [23 J – 62 J]
Geschlecht:	40 % ♀, 60 % ♂	35 % ♀, 65 % ♂
Raucherstatus:	65 % Nie-Raucher	59 % Nie-Raucher
Berufsgruppen:	Beschäftigungen ohne Schimmel-exposition	Baumpfleger, Beschäftigte in der Forstwirtschaft/forstwirtschaftlichen Forschung
Spezifisches IgE gegen <i>Cryptostroma corticale</i> Sporen (bg508) (mg _A /L): Median [Min-Max; 90%-Quantil]	7,44 [1,0 – 115,31; 17,31]	8,17 [2,55 – 17,92; 13,04]
Spezifisches IgG gegen <i>Cryptostroma corticale</i> Mycel (bg515) (mg _A /L): Median [Min-Max; 90%-Quantil]	6,65 [0,88 – 95,02; 17,37]	5,79 [2,26 – 17,27; 11,65]

Tab. 1 Charakteristika der Referenzkollektive

Seren wurden jeweils die spezifische IgG-Konzentration gegen die hergestellten *C. corticale*-Sporen- bzw. Myzelextrakte im ImmunoCAP-System gemessen. Die sIgG-Konzentrationen (Median und 90%-Quantil) auf Sporen- und Myzel-Antigene waren in beiden Kollektiven vergleichbar.

Fazit

Die vom IPA entwickelten diagnostischen Tools zur spezifischen IgG-Messung auf Antigene von *C. corticale* Sporen- und Myzelantigenen ermöglichen es, EAA-Verdachtsfälle von Beschäftigten mit klinischen Symptomen, bei denen eine Exposition gegen *C. corticale* vermutet wird, quantitativ zu analysieren. Der Vergleich der spezifischen IgG-Konzentration im Serum des jeweiligen Patienten mit denen der Referenzkollektive macht es möglich, die serologische IgG-Konzentration einzuordnen. Erhöhte spezifische IgG-Antikörperwerte im Serum von Patienten stellen einen wichtigen Baustein in der Diagnose einer EAA dar und leisten damit einen Beitrag zur komplexen Diagnosestellung. Wie wertvoll diese diagnostischen Tools sind, konnte in der Vergangenheit bereits unter anderem für EAA-Verdachtsfälle, verursacht durch Kühlschmierstoffe, gezeigt werden (Kespohl et al. 2020). Diese am IPA entwickelten spezifischen Testungen können bei entsprechenden Verdachtsfällen angefordert werden (Formular unter www.ipa-dguv.de/ipa/forschung/baproj/index.jsp). Die beiden Testtools *C. corticale* Sporen (bg508) und *C. corticale* Myzel (bg515) befinden sich ebenfalls in der Anforderungsliste.

Danksagung

Wir bedanken uns bei den Unfallversicherungsträgern, die an diesem Projekt beteiligt waren, insbesondere bei Herrn Eckart Willer (BG-Verkehr), Herrn Reinhold Watzele und Frau Dr. Alexandra Riethmüller (SVLFG) und Herrn Dr. Stephan Mayer (BG-HW). Die Rekrutierung des exponierten Kollektivs erfolgte durch Herrn Michael Spremann (SVLFG), dem hier auch ausdrücklich für seine Unterstützung gedankt sei. Für den technischen Support bedanken wir uns bei Frau Gudrun Seiffert und Frau Sabine Remmele (FVA), bei Frau Dagmar Trautmann und Herrn Henrike Gottfried (JKI) und Frau Ursula Meurer und Frau Silke Maryska (IPA).

Die Autoren:

Dr. Sabine Kespohl
Prof. Dr. Monika Raulf
IPA

Dr. Jörg Grüner
Forstliche Versuchs- und Forschungsanstalt
Baden-Württemberg (FVA)

Dr. Rasmus Enderle
Dr. Janett Riebesehl
Julius Kühn-Institut, Braunschweig (JKI), Institut
für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst

Literatur

Braun M, Klingelhöfer D, Groneberg DA. Sooty bark disease of maples: the risk for hypersensitivity pneumonitis by fungal spores not only for woodman. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2021; 16(1), 1-7. DOI: 10.1186/s12995-021-00292-5

Eisenhawer C, Raulf M. Berufsbedingte exogen allergische Alveolitis – Auf die frühzeitige Diagnose kommt es an! *IPA Journal* 2020; 01: 24-27

Emanuel D, Wenzel F, Lawton B. Pneumonitis due to *Cryptostroma corticale* (Maple-bark disease). *N Engl J Med* 1966; 274: 1413–1418. DOI: 10.1056/NEJM196606232742504.

Enderle R, Riebesehl J, Becker P, Kehr R. Rußrindenkrankheit an Ahorn – Biologie, Pathologie und Entsorgung von Schadholz. In: Dujesiefken, D. (Hrsg.): *Jahrbuch der Baumpflege 2020*. Braunschweig, 85-100.

Grüner J, Berens A, Delb H. Die Ahorn-Rußrindenkrankheit in Südwestdeutschland: Gefahren, Prognose und Empfehlungen. *Waldschutz-Info* 2020; 2: 1-8. CID: 20.500.12592/0h1wjg

Kespohl S, Warfolomeow I, Schneider G, Maryska S, Meurer U, Raulf M. Microbial contamination in water-based metalworking fluid as trigger for occupational hypersensitivity pneumonitis – development of specific IgG tools for a suspected clinical case. *Allergologie select* 2020; 4: 110–117. DOI: 10.5414/ALX02124E.

Kespohl S, Raulf M. Rußrindenkrankheit – Vorsicht bei Kontakt mit Ahornbäumen. *VKS News* 2022; 263: 11-14.

Raulf M, Joest M, Sander I, Hoffmeyer F, Nowak D, Ochmann U. Update of reference values for IgG antibodies against typical antigens of hypersensitivity pneumonitis. *Allergo J Int* 2019; 28: 192–203. DOI: 10.1007/s40629-019-0099-x.

Shepherd G, Michelis M, Macris N, Smith J. Hypersensitivity pneumonitis in an orchid grower associated with sensitivity to the fungus *Cryptostroma corticale*. *Ann Allergy* 1989; 62: 522–525.

Tewksbury D, Wenzel F, Emanuel D. An immunological study of maple bark disease. *Clin Exp Immunol* 1968; 3: 857–863.

Wenzel F, Emanuel D. The Epidemiology of Maple Bark Disease. *Arch Environ Health* 1967; 14: 385–389. DOI: 10.1080/00039896.1967.10664759.