

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Krönke

**Speziesverteilung und Resistenzepidemiologie von *Candida* Spezies aus einer
multizentrischen Blutkulturstudie – Evaluierung eines semiautomatisierten
Verfahrens (VITEK 2) zur Resistenztestung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Lea Geurtz
aus Duisburg

Promoviert am 10. November 2010

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. H. Seifert

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. G. Fätkenheuer

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Harald Seifert sowie von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Hilmar Wisplinghoff erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin / eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 20. Mai 2010

Die in dieser Studie untersuchten *Candida* Isolate wurden in dem Zeitraum von 1997 bis 2006 aus unterschiedlichen geographischen Regionen der USA ohne meine Mithilfe zusammengetragen.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente und Untersuchungen sind nach Anleitung von Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Harald Seifert und von Frau Danuta Stefanik von mir selbst und von Frau Jenny Ebberts durchgeführt worden.

Danksagungen

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Harald Seifert für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und aller arbeitsnotwendigen Mittel. Ganz besonders danke ich Ihm für die sorgfältige, hilfreiche und jederzeit freundliche Betreuung bei der Erstellung der hier vorliegenden Arbeit.

Desweiteren danke ich Herrn Privatdozenten Dr. med. Hilmar Wisplinghoff für die hilfreiche und immer freundliche Unterstützung bei der Datenauswertung.

Außerdem gilt mein Dank der Medizinisch-Technischen Assistentin Frau Danuta Stefanik, die mir im Hinblick auf die praktische Durchführung mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Jenny Ebbers danke ich sehr herzlich für die produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Candida – Mikrobiologie	1
1.2	Candida – Infektionen: Manifestationen und klinische Bedeutung	2
1.3	Epidemiologie der <i>Candida</i> Spezies	3
1.4	Hintergründe der SCOPE-Studie sowie der in Köln untersuchten Patienten-Isolate	5
1.5	Antimykotika und Resistenzen	7
1.6	Resistenzbestimmungsmethoden	11
1.7	Fragestellung	14
2.	Material und Methoden	16
2.1	Beschreibung des untersuchten Stammkollektivs	16
2.2	Lagerung und Kultivierung der Stämme	16
2.3	Identifizierung der <i>Candida</i> Spezies	17
2.3.1	Identifizierung mittels Chromagar durch ein Farbindikatorprinzip	17
2.3.2	Identifizierung mittels semiautomatisiertem Verfahren (VITEK 2)	18
2.3.2.1	Beschreibung des VITEK 2 Mikrobiologie Systems und der VITEK 2-YST-Identifizierungskarte	18
2.3.2.2	Untersuchungsablauf	21
2.3.3	Identifizierung mittels Assimilationsreaktionen (API ID 32C)	21
2.4	Resistenzbestimmung der <i>Candida</i> Spezies	22
2.4.1	Resistenzbestimmung mittels standardisierter Mikrobouillondilution (CLSI Referenzmethode)	22
2.4.1.1	Das Prinzip der Mikrobouillondilutionsmethode	22
2.4.1.2	Untersuchungsablauf	23
2.4.2	Resistenzbestimmung mittels semiautomatisiertem Verfahren (VITEK 2)	25
2.4.2.1	Beschreibung des VITEK 2 Mikrobiologie Systems und der VITEK 2-Resistenzkarte für Hefen	25
2.4.2.2	Untersuchungsablauf	26

3.	Ergebnisse	28
3.1	Speziesverteilung	28
3.2	Übersicht über die resistenzgetesteten <i>Candida</i> Isolate	29
3.3	Resistenztestung gegenüber den 4 Antimykotika Amphotericin B, Fluconazol, Voriconazol und 5-Fluorocytosin	30
3.3.1	Empfindlichkeit gegenüber Amphotericin B	31
3.3.2	Empfindlichkeit gegenüber 5-Fluorocytosin	31
3.3.3	Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol	32
3.3.4	Empfindlichkeit gegenüber Voriconazol	33
3.4	Ergebnisse der Resistenztestung verschiedener <i>Candida</i> Spezies	35
3.4.1	Empfindlichkeit von <i>C. albicans</i>	35
3.4.2	Empfindlichkeit von <i>C. glabrata</i>	37
3.4.3	Empfindlichkeit von <i>C. krusei</i>	39
3.4.4	Empfindlichkeit von <i>C. lusitaniae</i>	41
3.4.5	Empfindlichkeit von <i>C. parapsilosis</i>	42
3.4.6	Empfindlichkeit von <i>C. tropicalis</i>	43
3.4.7	Resistenztestung der übrigen <i>Candida</i> Spezies	45
3.5	Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der Resistenzbestimmung mittels Mikrobouillondilution im standardisierten Verfahren und dem semiautomatisierten Verfahren für verschiedene Antimykotika	46
3.5.1	Amphotericin B	48
3.5.2	5-Fluorocytosin	50
3.5.3	Fluconazol	51
3.5.4	Voriconazol	52
4.	Diskussion	54
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	71

1. Einleitung

1.1 Candida – Mikrobiologie

Pilze sind eukaryontische Mikroorganismen, das heißt, sie beinhalten im Gegensatz zu Prokaryonten einen Zellkern, der durch eine Kernmembran vom Zytoplasma abgegrenzt ist. Neben dem Zellkern mit dem Genom sind im Zytoplasma typische Organellen wie Mitochondrien, Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum vorhanden. Die Pilzzelle besitzt eine stabile Zellwand, die hauptsächlich aus hochkomplex vernetzten Kohlenhydraten wie Chitin, fibrillären Glucanen und Mannan aufgebaut ist. Weiter innen befindet sich eine Zellmembran, die überwiegend aus Ergosterol besteht. Pilze ernähren sich kohlenstoffheterotroph und benötigen somit organische Kohlenstoffquellen, die sie mit Hilfe der von ihnen gebildeten Exoenzyme verstoffwechseln können. Diese Exoenzyme sind auch bedeutend für den Infektionsprozess, zum Beispiel im Rahmen von Keratinolyse. Die Vermehrung von Pilzen untergliedert sich in anamorphe (ungeschlechtliche) und teleomorphe (geschlechtliche) Wachstumsformen. Bei Pilzen, die im Rahmen von menschlichen Infektionen isoliert werden, handelt es sich in der Regel um anamorphe Formen.

Hefen sind einzellige Pilze, die in der Natur vorzugsweise auf zuckerhaltigen Substraten wie Obst zu finden sind und in der Lebensmittelindustrie biotechnologisch in großem Umfang eingesetzt werden. Ihre Vermehrung findet vorzugsweise ungeschlechtlich durch Zellsprossung statt. Diese Sprossung gestaltet sich als Ausstülpung der Zellwand und kann unipolar, bipolar oder multipolar erfolgen. Hierdurch entwickeln sich Tochterzellen, die als Blastokonidien bezeichnet werden. Man kann basidiomycetale Hefen von ascomycetalen unterscheiden, wobei die Gattung *Candida* zu der letzteren Gruppierung gehört. Es gibt mehr als 150 verschiedene *Candida* Spezies, allerdings sind für menschliche Infektionen vor allem *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* medizinisch relevant. *C. albicans* gilt bei der Infektionskrankheit Candidiasis als die weltweit am häufigsten zu isolierende *Candida* Spezies. Bei ca. 80% der Menschen kann dieser Pilz vor allem im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Bei Vorhandensein von prädisponierenden Faktoren kann es zu manifesten Krankheitserscheinungen wie zum Beispiel einem Mundsoor oder einer Vaginalmykose kommen [24, 32, 35].

1.2 Candida – Infektionen: Manifestationen und klinische Bedeutung

Die Manifestationen einer Sprosspilzinfektion sind aufgrund von verschiedenen Adaptions- und Virulenzfaktoren sehr variabel. Zu solchen für die Pathogenese wichtigen Virulenzfaktoren gehört zum Beispiel die besondere Adhärenz an Epithelzellen, wobei Glykoproteine als Adhäsionsmoleküle fungieren. Als weitere Faktoren gelten die Fähigkeit, adaptiv unterschiedliche Oberflächenstrukturen auszubilden (phenotypic switching), die Fähigkeit, sich durch molekulares Mimikry der Immunantwort zu entziehen, eine kurze Regenerationszeit, die Resistenz gegenüber Milieuschwankungen in einem breiten Temperatur- und pH-Bereich, die Sekretion lytischer Enzyme (Proteinasen, Phospholipasen), Toxinbildung sowie die Fähigkeit, Keimschläuche auszubilden. Keimschläuche sind morphologische Strukturen, durch welche die Adhärenz und damit auch Virulenz erhöht werden kann. Infektionen der Haut finden vor allem dort statt, wo es feucht, warm und dunkel ist. Somit sind insbesondere Axillarfalten, Mamillarfalten und urogenitale Falten bei Adipositas für die intertriginöse Candidiasis prädisponierend. Weitere Hautmanifestationen sind zum Beispiel die Windeldermatitis bei Säuglingen, Onychomykosen und Paronychien, Erosio interdigitalis blastomycetica (Candidiasis der Zehen und Fingerzwischenräume) sowie die chronische mukokutane Candidiasis. Schleimhautinfektionen können sich in Form von Mundsoor, Candida Ösophagitis, gastrointestinaler Candidiasis sowie der Candida Kolpitis manifestieren. Von diesen oberflächlichen Formen der Candidiasis unterscheidet sich die tiefe (invasive) Candidiasis. Hierzu zählen der Befall des Respirationstraktes (Candida Bronchitis, Candida Pneumonie, Candida Laryngitis und Epiglottitis), der Befall des Herzens (Candida Endokarditis, Candida Myokarditis und Candida Perikarditis), der Befall des zentralen Nervensystems (Candida Meningitis) und der Befall des Harntraktes (Candida Zystitis, Candida Nephritis). Weiterhin kommen die Candida Arthritis, die Candida Osteomyelitis, die Candida Peritonitis, die Candida Pankreatitis und die Candida Endophthalmitis (okuläre Candidiasis), sowie der Befall von Leber, Milz und Gallenblase vor [24, 32, 38, 39].

Bei Anschluss an das Blutssystem kann es zur Candidämie und dem Syndrom der disseminierten Candidiasis kommen. Generalisierte Mykosen werden zunehmend beobachtet und sind mit einer hohen Letalität verbunden. In dem Zeitraum von 1979 bis 2000 hat die jährliche Anzahl von pilzverursachten Sepsis-Fällen in den

Vereinigten Staaten um 207% zugenommen [44]. In den USA sind *Candida* Spezies (nach Koagulase-negativen Staphylokokken, *Staphylococcus aureus* und Enterokokken) mit einem Anteil von 8-10% der vierthäufigste Grund für nosokomiale Blutstrominfektionen [96]. Eine weitere veröffentlichte Studie von McNeil et al. veranschaulicht den Wandel der Mortalität bedingt durch Infektionskrankheiten. Hierbei wird eine Zunahme der durch Mykosen bedingten Sterblichkeit von 1557 Todesfällen im Jahr 1980 auf 6534 Todesfälle im Jahr 1997 in den USA deutlich. Die Hauptverursacher waren hierbei *Candida*, *Aspergillus* und *Cryptococcus* Spezies [46].

Der wichtigste Grund für diese deutliche Zunahme von Pilzinfektionen ist die wachsende Anzahl von immunkomprimierten Patienten. Bedeutsam für das Auftreten opportunistischer Pilzinfektionen sind in diesem Zusammenhang qualitative und quantitative Defizite der Neutrophilen, Barrierestörungen von Haut und Schleimhaut, metabolische Störungen, ein Alter unter einem Jahr oder über siebenzig Jahren, die zunehmende Nutzung zytotoxischer Chemotherapien und Breitbandantibiotika sowie die nach Transplantationen folgende Gabe von Immunsuppressiva [50, 64, 82].

1.3 Epidemiologie der *Candida* Spezies

Es sind über 17 Spezies der Gattung *Candida* als Verursacher menschlicher Candidiasis bekannt [35, 64]. Von diesen gelten allerdings global betrachtet *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. krusei* in über 90% als die krankheitsverursachenden Spezies. In einer Studie, die am Universitätsklinikum Köln durchgeführt wurde, steht *C. albicans* mit 56,1% an erster Stelle der aus Blutkulturen nachgewiesenen *Candida* Spezies, gefolgt von *C. glabrata* (15,5%), *C. tropicalis* (8,4%), *C. parapsilosis* (7,8%) und *C. krusei* (3,7%) [83].

Während klinische Laboratorien unter dem Druck stehen, Speziesidentifizierungen als Beitrag für die Therapieoptimierung zu liefern, wächst die Anzahl der krankheitsverursachenden Spezies fortlaufend [54, 60, 64, 77, 86]. Auch im Rahmen des Antifungal Surveillance Programmes (ARTEMIS), bei dem 134.715 klinische *Candida* Isolate in 127 medizinischen Zentren in 39 Ländern in einem Zeitraum von 1997 bis 2003 bearbeitet wurden [65], ist diese Tendenz zu beobachten: Die Liste der aus klinischen Proben isolierten Spezies wird jedes Jahr größer. Das kann wahrscheinlich damit begründet werden, dass die Laboratorien zunehmend sowohl

neuere kommerziell erhältliche als auch klassische Methoden für die mykologische Speziesidentifizierung anwenden. Desweiteren wächst auch durch die weltweite Zunahme immunkomprimierter Patienten die Anzahl opportunistischer Spezies, die ehemals als nicht pathogen galten [36, 50, 60, 64].

Neben der Erkenntnis der zunehmenden Speziesvielfalt gibt es auch einen Wandel in der prozentualen Häufigkeitsverteilung der krankheitsverursachenden Spezies. Trotz der Tatsache, dass weltweit *C. albicans* Hauptverursacher der invasiven Candidiasis geblieben ist, kann ein absteigender Trend bei der Isolation dieser Spezies im Vergleich zu anderen Spezies beobachtet werden [60]. Dieser Rückgang des Vorkommens von *C. albicans* geht einher mit Beobachtungen zu invasiver Candidiasis auf Intensivstationen in den Vereinigten Staaten [88]. Auf internationaler Ebene zeigen die beiden Spezies *C. glabrata* und *C. krusei* bezüglich ihrer Isolationsrate weder eine Ab- noch eine Zunahme, bei *C. tropicalis* wurde eine Zunahme von 4,6% auf 7,5% und bei *C. parapsilosis* eine Zunahme von 4,2% auf 7,3% in den Jahren zwischen 1997 und 2003 beobachtet [65].

Durch die Zunahme von Anzahl und Bandbreite der auf Mykosen ausgerichteten Überwachungsprogramme gibt es einen enormen Umfang von Daten. Diese Daten zeigen nicht nur zeitliche, sondern auch geographische Schwankungen bei der Speziesverteilung von *Candida* Isolaten. Obwohl *C. albicans* auch global betrachtet die dominierende Spezies bei Blutstrominfektionen bleibt, variiert die Erscheinungsfrequenz weltweit. Besonders niedrig erscheint sie mit einem Anteil von 37% in Lateinamerika und besonders hoch mit einem Anteil von 70% in Norwegen. Die Spezies *C. glabrata* gilt mit 20 bis 24% hinter *C. albicans* als zweithäufigster Verursacher von *Candida* Blutstrominfektionen in den Vereinigten Staaten. Allerdings gilt diese Spezies in den meisten anderen Ländern als weit weniger üblich. Bemerkenswert ist zum Beispiel ein sehr geringes Vorkommen von *C. glabrata* in Lateinamerika mit nur 4 bis 7%. Die Gründe für diese starken geographischen Frequenzschwankungen von *C. glabrata* als Verursacher von Blutstrominfektionen sind nicht eindeutig klar, allerdings wird unter anderem die Exposition gegenüber Azolen, das Alter des Patienten und die vorliegende Grunderkrankung diskutiert [60]. Im Gegensatz zu den USA gelten in vielen anderen Ländern neben *C. albicans* die Spezies *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* als meist vertretende Verursacher von *Candida* Blutstrominfektionen. Das vermehrte Vorkommen von invasiver Candidiasis

bedingt durch *C. parapsilosis* kann insbesondere in Lateinamerika beobachtet werden.

Laut Studienlage werden Blutstrominfektionen, die durch *C. parapsilosis* bedingt sind, in 38% der Fälle außerhalb des Krankenhauses erworben. Diese Feststellung ist mit der Tatsache vereinbar, dass es eine Zunahme von Behandlungskonzepten verbunden mit dem Einsatz von intravasalen Kathetern in der ambulanten Versorgung von chronisch erkrankten Patienten gibt. *C. parapsilosis* wird sowohl mit intravaskulären Kathetern als auch mit parenteraler Ernährung assoziiert. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass *C. parapsilosis* bekannt für seine Fähigkeit ist, einen Biofilm auf Kathetern und anderen implantierbaren Materialien bilden zu können. Blutstrominfektionen bedingt durch diese Spezies gehen allerdings mit einer geringeren Sterblichkeitsrate einher als Blutstrominfektionen, die durch andere Spezies bedingt sind [1, 33, 55, 60]. Entgegengesetzt der abnehmenden Frequenz von den durch *C. tropicalis* verursachten Blutstrominfektionen in den Vereinigten Staaten wird eine zunehmende Frequenz auf globaler Ebene betrachtet. Zum Beispiel ist *C. tropicalis* in Lateinamerika mit einem Anteil von 20% als häufiger Verursacher vertreten. *C. tropicalis* gilt als wichtiger Krankheitserreger bei Patienten mit Neutropenie sowie bei Patienten mit hämatoonkologischen Malignomen. Krebspatienten mit einer durch *C. tropicalis* verursachten invasiven Candidiasis leiden eher an einer länger anhaltenden Fungämie und verbringen eine größere Anzahl von Tagen auf der Intensivstation als Krebspatienten mit invasiver Candidiasis verursacht durch *C. albicans* [43].

1.4 Hintergründe der SCOPE-Studie sowie der in Köln untersuchten Patienten-Isolate

Das SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance) System ist das erste nicht staatliche Projekt, das nosokomial erworbene Blutstrominfektionen auf nationaler Ebene in den USA prospektiv verfolgt. Mit der Basis verankert an der Virginia Commonwealth Universität in Richmond, Virginia, wurden 49 Krankenhäuser für weitergehende Beobachtungen ausgewählt. Diese Krankenhäuser sind von unterschiedlicher Größe (60-1200 Betten) sowie von unterschiedlicher geographischer Verteilung innerhalb der Vereinigten Staaten von Amerika (siehe Abbildung 1.4). Im Vordergrund des SCOPE Projektes stehen vor

allem epidemiologische Trends nosokomial erworbener Pathogene, Resistenzen gegenüber Antiinfektiva sowie essentielle Risikofaktoren [23, 96].

Abbildung 1.4: Lokalisationen der an dem SCOPE Programm teilnehmenden Krankenhäuser [96]



Bei den in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Stämmen handelte es sich um Patienten-Isolate, die im Rahmen der SCOPE Studie gesammelt wurden. Die zugehörigen klinischen Daten wurden von den einzelnen Krankenhäusern in Form einer standardisierten Falldokumentation zusammengetragen und zusammen mit den Patienten-Isolaten an das Koordinationszentrum der Virginia Commonwealth Universität gesendet. Auf der Basis der vorliegenden SCOPE Daten wurden all diejenigen Patienten identifiziert, die in dem Zeitraum vom 1. Dezember 1997 bis zum 31. Mai 2006 an einer nosokomialen, durch *Candida* Spezies verursachten Blutstrominfektion litten. Eingeschlossen wurden demnach solche Patienten, bei denen frühestens 48 Stunden nach Aufnahme in einer oder mehreren Blutkulturen *Candida* Spezies nachgewiesen wurden. Ausgeschlossen wurden Blutstrominfektionen, die sich als Rezidive erwiesen. Zweite Episoden von

Blutstrominfektionen, die bei unterschiedlichen Krankenhausaufenthalten in einem Krankenhaus auftraten, wurden als separate Fälle beobachtet. Die zugehörigen, routinemäßig gesammelten Patientendaten beinhalteten Informationen über Alter, Geschlecht, Grunderkrankung, Risikofaktoren, Aufenthalt auf einer Intensivstation, Krankheitsfokus sowie über den Entlassungsstatus des Patienten [96].

1.5 Antimykotika und Resistenzen

Bis 1985 galten die Antimykotika Amphotericin B und 5-Fluorocytosin als einzige Therapieoptionen. Amphotericin B wird seit 1960 verabreicht, wohingegen die Einführung von 5-Fluorocytosin im Jahre 1972 folgte. Erst in den 80iger Jahren, durch die steigende Anzahl generalisierter Pilzinfektionen sowie das vermehrte Vorkommen opportunistischer Pilzpathogene, insbesondere auch im Zusammenhang mit dem Aufkommen von AIDS, wurde das Spektrum der erhältlichen Antimykotika erweitert und die Azolderivate erschienen als weitere Therapiemöglichkeit auf dem Markt. Nach der Einführung von Fluconazol folgte kurze Zeit später das Derivat Itraconazol, in den 90iger Jahren dann weitere Azolgenerationen und eine verbesserte Darreichungsform von Amphotericin B. Schließlich erschienen die Echinocandine mit Caspofungin als erstem Vertreter dieser Substanzklasse ab dem Jahr 2001 [30, 31].

Amphotericin B

Das Polyen Amphotericin B wirkt über eine Komplexbildung mit Ergosterol, einem Anteil der Pilzmembran, wodurch es zu einer Porenbildung und damit einhergehender Änderung der Permeabilität der Membran kommt. Amphotericin B wird bei schweren invasiven Pilzinfektionen eingesetzt, allerdings sind die ausgeprägten Nebenwirkungen therapiebegrenzend [31]. Da Amphotericin B auch eine gewisse Bindungsaffinität an menschliches Cholesterin besitzt, kann es zu einer Membranschädigung im proximalen Tubulus und somit zu einer Nierenfunktionsstörung kommen. Die Nephrotoxizität von Amphotericin B, welches klassischerweise in der Formulierung mit Desoxycholat verabreicht wird, geht nachweislich mit einer erhöhten Sterblichkeit einher [22]. Die Literatur berichtet von einem akuten Nierenversagen bei bis zu 50% der Patienten, welche mit Amphotericin

B behandelt werden [52]. Als weitere Nebenwirkungen werden Übelkeit, Schüttelfrost, Fieber und Thrombophlebitis genannt.

Eine Alternative stellt liposomal verkapseltes Amphotericin B dar, das wegen der langsameren Abgabe des Wirkstoffes geringere Spitzenbelastungen erzeugt, somit weniger toxisch ist und in höheren Dosen verabreicht werden kann. Als Nachteil von Lipid-Zubereitungsformen sind die höheren Kosten zu erwähnen [5, 37, 95].

Die Wirksamkeit von Amphotericin B umfasst ein sehr großes Spektrum von Hefe- und Schimmelpilzen – allerdings wird über eine geringere Empfindlichkeit von *C. lusitaniae* im Vergleich zu anderen Hefen berichtet [47, 92]. Außerdem scheint die Spezies *C. glabrata* eine geringere Sensitivität aufzuweisen: Bei der Ermittlung von MHK-Werten mittels des E-Tests konnte festgestellt werden, dass ein Anteil von 75% dieser Spezies einen MHK-Wert von <1,0 mg/l besaß, wohingegen 2% einen Wert von >2,0 mg/l aufwiesen. Auch *C. krusei* demonstrierte eine reduzierte Sensitivität gegenüber Amphotericin B – nur 8% dieser Spezies wiesen einen MHK-Wert von ≤1,0 mg/l auf, wohingegen mehr als 50% der Stämme Werte von ≥4,0mg/l zeigten [64].

5-Fluorocytosin

Flucytosin (5-Fluorocytosin) wird anstelle der Nukleinbase Cytosin in die Pilzzelle aufgenommen und hier enzymatisch zu 5-Fluorouracil umgewandelt, wodurch die Nukleinsäuresynthese inhibiert wird. 5-Fluorocytosin sollte wegen der Gefahr von sekundärer Resistenzbildung nur in der Kombination mit anderen Antimykotika verabreicht werden. Üblich ist die zusätzliche Gabe von Amphotericin B bei generalisierten Infektionen, wodurch eine synergistische Wirkung erzielt wird. Durch eine Kombination dieser Antimykotika kann einerseits die Toxizität von Amphotericin B aufgrund der geringeren notwendigen Dosierung gesenkt und andererseits die Ausbildung sekundärer Resistenzen gegenüber 5-Fluorocytosin vermindert werden. Als Nebenwirkungen können neben einer meist reversiblen Knochenmarksschädigung auch gastrointestinale Beschwerden auftreten [30, 31]. Primäre Resistenzen wurden bei den Spezies *C. tropicalis* und *C. krusei* beobachtet, doch sind es insgesamt gesehen eher die sekundären Resistenzen, welche den klinischen Nutzen limitiert haben und von einer Monotherapie abraten lassen [41, 70].

Triazole

Die Wirkung von Azolen besteht in der Hemmung der Ergosterolsynthese in der Pilzmembran durch Eingriff in das Cytochrom P450 System. Durch den Eingriff in dieses System kann es allerdings auch zu vielseitigen Arzneimittelinteraktionen kommen, welche klinisch berücksichtigt werden müssen. Weiterhin können Nebenwirkungen in Form von gastrointestinalen, hepatischen und hämatologischen Beschwerden auftreten [30]. Die Derivate Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol und Posaconazol demonstrieren ähnliche Effektivität gegenüber den meisten *Candida* Spezies [52].

Innerhalb großer klinischer Studien zeigte sich Fluconazol bei invasiver Candidiasis in seiner Effektivität vergleichbar mit Amphotericin B [76, 79]. Außerdem kann Fluconazol als Standardtherapie bei oropharyngealer, ösophagealer und vaginaler Candidiasis verwendet werden. Von den Triazolderivaten ist Fluconazol dasjenige, welches am besten sowohl in den Liquor als auch in den Glaskörper penetrieren kann. Aus diesem Grund wird Fluconazol bei *Candida* Infektionen des ZNS und intraokulärem Befall eingesetzt [2, 52, 84].

Voriconazol ist bei einem Schleimhautbefall und auch bei invasiver Candidiasis effektiv, bietet aber nur wenige Vorteile gegenüber Fluconazol. Empfohlen wird es im Rahmen einer Step-down-Therapie für bestimmte Isolate wie *C. krusei* oder fluconazol-resistente *C. glabrata* Stämme. Zum Beispiel kann eine invasive Candidiasis bedingt durch diese *Candida* Spezies initial mit einem Echinocandin intravenös, anschließend dann mit Voriconazol oral behandelt werden. Generell wird in Bezug auf die invasive Candidiasis das Behandlungskonzept der Step-down-Therapie, also eine Deeskalationstherapie, empfohlen. Diese kann im Hinblick auf die verschiedenen Antimykotika unterschiedlich zusammengestellt sein, je nach der jeweiligen Krankheitsmanifestation und der verursachenden *Candida* Spezies [52]. Oral verabreicht erreicht Voriconazol sowohl im Kammerwasser und auch im Glaskörper zufriedenstellende therapeutische Spiegel, so dass dieses Antimykotikum auch für die fungale Endophthalmitis bedeutsam ist [34].

Bevor das HIV-Behandlungskonzept HAART (highly active antiretroviral therapy) in den späten 90iger Jahren eingeführt wurde, galt die sekundäre Resistenzbildung gegenüber Azolen von *C. albicans* Stämmen, die bei HIV Patienten oropharyngeal isolierten wurden, als ein ernsthaftes Problem. Doch dieses damals neue Behandlungskonzept und auch die Erkenntnis, dass höhere Dosierungen und

kürzere Verabreichungszeiten von Fluconazol seltener zur Resistenzinduktion führen, führte wieder zu einer verminderten Rate von Fällen mit oropharyngealer Candidiasis [41]. Eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol (mit einem Anteil sensibler Isolate von weniger als 75%) tritt heute vor allem bei den Spezies *C. glabrata* und *C. krusei* auf. Auch bei selteneren Spezies wie *C. guilliermondii*, *C. rugosa* und *C. norvegensis* werden auf internationaler Ebene sowohl natürliche als auch erworbene Resistenzen beobachtet. Die meisten Spezies, die eine sekundäre Resistenz gegenüber Fluconazol entwickelt haben, sind gleichzeitig auch signifikant weniger sensibel gegenüber Voriconazol. Dagegen erscheinen Spezies mit primären Resistenzen (wie *C. krusei* und *C. norvegensis*) empfindlich gegenüber Voriconazol [68].

Echinocandine

Echinocandine sind (1-3)- β -Glucansynthetase-Inhibitoren. Während Glucan ein Hauptbestandteil der Zellwand vieler Hefen ist, ist diese Struktur in Säugetierzellen nicht vorzufinden. Diese Tatsache hat den Vorteil, dass keine Nebenwirkungen aufgrund gleicher Targets auftreten können. Viele Studien zeigen sowohl im Hinblick auf die invasive Candidiasis als auch auf die ösophageale Candidiasis eine gute Wirksamkeit der Echinocandine [53, 75, 90].

Viele *Candida* Spezies, eingeschlossen auch *C. krusei* und *C. glabrata*, weisen in vitro niedrige MHK-Werte auf [6]. Allerdings scheint es in vitro eine Lücke in der fungiziden Wirkung von Caspofungin gegenüber *C. parapsilosis* und *C. guilliermondii* zu geben [4]. Dennoch scheinen Echinocandine im Hinblick auf die klinische Effektivität bei Blutstrominfektionen bedingt durch *C. parapsilosis* erfolgreich zu sein, trotz der Tatsache, dass die MHK-Werte für diese Spezies höher sind [91]. Auch in einer Studie von Pfaller et al., welche geographischen und zeitlichen Trends in Bezug auf die Empfindlichkeit von *Candida* Spezies gegenüber Caspofungin nachging, zeigte sich, dass mehr als 99% der getesteten Isolate MHK-Werte von $\leq 1,0$ mg/l aufwiesen. Bis heute scheinen also weder primäre noch sekundäre Resistenzen besonders bedeutsam zu sein. Sowohl Caspofungin als auch die Echinocandine Anidulafungin und Micafungin demonstrieren dieselbe antifungale Wirksamkeit [41, 59, 60].

1.6 Resistenzbestimmungsmethoden

In Bezug auf die Korrelation der in vitro Testergebnisse mit dem klinischen Therapieerfolg gilt heute im Allgemeinen die „90-60-Regel“: Bei 90% der als sensibel getesteten *Candida* Isolate ist das entsprechende Antimykotikum erfolgreich. Bei immerhin 60% der als resistent getesteten *Candida* Isolate kann mit einem zufriedenstellenden Ansprechen der Therapie gerechnet werden. Dieses liegt daran, dass Wirtsfaktoren, wie zum Beispiel der Immunstatus des Patienten, Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit, sowie Unterschiede zwischen oberflächlichen und invasiven Mykosen Einfluss auf die Effektivität der Therapie haben [77].

Die Notwendigkeit einer akkuraten sowie reproduzierbaren Empfindlichkeitsprüfung steht im Zusammenhang mit dem wachsenden Angebot systemischer Antimykotika. Frühere Aussagen zum Thema Resistenzverhalten werden aufgrund der unterschiedlichen Vorgehensweise bei den Testungen in Frage gestellt: In den späten 80iger Jahren waren die Testmethoden noch nicht standardisiert und deshalb die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gering. Somit wurden seitens der Laboratorien nicht nur intra- sondern auch interindividuell unterschiedliche Testergebnisse ermittelt [29]. Variablen wie zum Beispiel die Größe des Inokulums, die Komposition und der pH-Wert des Testmediums, die Temperatur und die Dauer der Inkubation wirken sich auf die MHK-Wert-Bestimmung aus. Umfassend belegte dies eine Studie von Rambali et al., die die Auswirkungen von unterschiedlichen Kombinationen von 10 Testvariablen auf das Endergebnis beschreibt. Hierbei geht es um die Empfindlichkeit von einer Reihe von *Candida* Spezies und filamentösen Pilzen gegenüber Itraconazol. Allein die Modifikation der Testkonditionen konnte dieselben Isolate als sensibel oder resistent erscheinen lassen, was den Bedarf einer Vereinheitlichung der Methodik verdeutlicht [74].

Die erste optimierte und standardisierte Empfindlichkeitsprüfung für Hefen stellte eine Methode mittels Mikrobouillondilution dar, die vom damaligen NCCLS, National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute (heute CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) entwickelt wurde: diese ist seit 1997 gegenüber Amphotericin B, 5-Fluorocytosin, Fluconazol sowie Itraconazol und seit 2002 auch gegenüber Voriconazol verfügbar. Heute gilt dieses Verfahren, dessen Methodik das NCCLS M27-A2 Dokument beschreibt, als weit akzeptierter Standard und Referenzmethode für die Entwicklung von sowohl bouillon- als auch agarbasierten

Prozessen der Empfindlichkeitsprüfung [15]. Die Testung kann dabei mit Mikrotiterplatten durchgeführt werden, wobei eine Verdünnungsreihe des Antimykotikums hergestellt und die benötigte Konzentration als MHK-Wert (minimale Hemmkonzentration) bestimmt werden kann. Bei der Testung von Hefen gegenüber Azolen kann es gegebenenfalls zu einem sogenannten „trailing effect“ kommen. Dieser Effekt beschreibt das Erscheinen von Wachstum jenseits der MHK bedingt dadurch, dass trotz höherer Antimykotika-Konzentrationen eine Subpopulation persistiert. Der Effekt führt zu unterschiedlich erscheinenden MHK-Werten, abhängig vom jeweiligen Ablesezeitpunkt. Durch dieses stammabhängige Wachstumsphänomen kann nach 24 Stunden ein niedriger MHK-Wert auftreten, während er nach 48 Stunden erhöht erscheinen kann [16].

Desweiteren wird eine Abwandlung der Mikrodilutionsmethode, aufgestellt vom European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), empfohlen, die nach 24 Stunden in einem Spektrophotometer abgelesen werden kann und somit eine schnelle und objektive Endpunktanalyse erlaubt. Eine internationale und multizentrische Studie testete in 6 Zentren die Empfindlichkeit von *Candida* Spezies gegenüber Fluconazol, Itraconazol, Posaconazol und Voriconazol sowohl mittels EUCAST als auch mittels NCCLS M27-A2 Mikrobouillondilution. Hierbei wurde aufgezeigt, dass MHK-Werte, die durch die EUCAST Methode ermittelten wurden, niedriger waren als diejenigen MHK-Werte, die durch die CLSI Referenzmethode ermittelt wurden. Demzufolge sind die vom NCCLS vorgegebenen Grenzwerte für die Zuordnung von MHK-Werten zu den interpretativen Kategorien „sensibel, intermediär und resistent“ nicht für die EUCAST Methode geeignet [25].

Ein weiteres kommerzielles Testformat ist das YeastOne-Verfahren, welches der NCCLS Methodik stark entspricht. Es basiert ebenfalls auf Mikrobouillondilution, allerdings beinhaltet es das chromogene Substrat *Alamar Blue* in den Platten, um die Endpunktinterpretation zu erleichtern. Die Resultate für *Candida* Spezies und auch für *Cryptococcus neoformans* korrelieren stark mit denen, die mittels NCCLS Methode zu beobachten sind [21]. Mittlerweile gilt auch die Testung gegenüber Voriconazol, Caspofungin und Posaconazol mittels des YeastOne Verfahrens als verlässlich [26]. Das Sensititre YeastOne system (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH) war das erste Test System, welches von der U.S. Food and Drug

Administration (FDA) für die in vitro Empfindlichkeitsprüfung von *Candida* Spezies gegenüber Fluconazol, Itraconazol und 5-Fluorocytosin anerkannt wurde [58, 71].

Als eine Möglichkeit der Empfindlichkeitstestung für die wasserlöslichen Antimykotika wie 5-Fluorocytosin, Fluconazol und Voriconazol gilt der Agardiffusionstest. Bei diesem breiten sich Hemmzonen auf dem bewachsenen Agar aus, welche mit dem entsprechenden MHK-Wert korrelieren sollen. Auch für diesen gibt es eine NCCLS Methode für die in vitro Empfindlichkeitstestung von *Candida* Isolaten. Im Rahmen des ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Programmes wurde eine zufriedenstellende Korrelation der Ergebnisse des Diffusionstestes mit MHK-Referenzwerten beobachtet [69].

Als weitere Möglichkeit können E-Test-Streifen, welche mit Konzentrationsgradienten unterschiedlicher Antimykotika beschichtet sind, auf Agarplatten mit ausplattierten Erregern platziert werden. Anhand der nach Inkubation erscheinenden Hemmzone kann der MHK-Wert abgelesen werden. Diese Methode korreliert laut Studienlage bei Durchführung durch einen erfahrenen Ableser ebenfalls gut mit dem NCCLS Standard [94]. Außerdem gilt die E-Test Methode (AB Biodisk, Solna, Sweden) von der FDA im Hinblick auf die in vitro Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Fluconazol und Itraconazol als anerkannt [45].

Bis vor einiger Zeit war das Testformat der Spektrophotometrie nicht als integrierte Komponente einer automatisierten, kommerziell erwerbbaaren Methode erhältlich. Klinische Laboratorien waren angewiesen auf die weiter oben beschriebenen, nicht automatisierten Ansätze der Empfindlichkeitstestung, deren Durchführung häufig als langwierig und mühsam empfunden wird. Die Entwicklung des VITEK 2 Mikrobiologie Systems durch bioMérieux ermöglicht nun die spektrophotometrische Bestimmung des Pilzwachstums und somit eine weitgehend automatisierte Empfindlichkeitstestung von *Candida* Spezies. Das VITEK 2 System erlaubt die Standardisierung von allen kritischen Parametern, welche für die antimykotische Empfindlichkeitsprüfung bekannt sind: die Erstellung des Inokulums, das Befüllen der Einheiten, Dauer und Temperatur der Inkubation und die Ermittlung der MHK-Werte. Die antimykotische Empfindlichkeitstestung, gekoppelt mit der Möglichkeit einer schnellen und genauen Pilzidentifizierung, die schon für VITEK 2 erhältlich ist,

erlaubt klinischen Laboratorien somit gleichzeitig, diese zwei Schritte in einem sowohl semiautomatisiertem als auch standardisiertem Format zu bewerkstelligen. In einer im Jahr 2007 veröffentlichten multizentrischen Evaluation zeigten sich zufriedenstellende Ergebnisse bei der Auswertung dieses Systems. In dieser Studie wurde das VITEK 2 System mit der CLSI Referenzmethode mittels Mikrobouillondilution in Bezug auf das Resistenzverhalten von 426 *Candida* Isolaten gegenüber Fluconazol getestet [63]. Demzufolge befürwortete die U.S. Food and Drug Administration den klinischen Gebrauch des VITEK 2 Systems zur Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Fluconazol in den USA. Im gleichen Jahr folgte eine Veröffentlichung derselben Autoren mit demselben Studiendesign mit der diesmaligen Testung der Antimykotika Amphotericin B, 5-Fluorocytosin und Voriconazol, um die Anzahl derjenigen Antimykotika auszuweiten, die für das VITEK 2 System erhältlich sein sollen. Auch in dieser Studie zeigte sich eine kategorienübergreifende Übereinstimmung beider Methoden [62].

Als übergreifendes Prinzip der Methoden der Empfindlichkeitstestung gilt die Zuordnung der MHK-Werte zu den Kategorien sensibel, intermediär und resistent. Diese Zuordnung erfolgt anhand standardisierter Grenzwerte und verhilft zur Therapieoptimierung für den einzelnen Patienten. Desweiteren können durch die Aggregation solcher Daten generelle Resistenzlagen erfasst werden, die bedeutsam für die Festlegung empirischer Therapien sind. Als sensibel gegen ein Antimykotikum gilt ein *Candida* Isolat dann, wenn es in vitro von einer bestimmten Konzentration gehemmt wird, welche mit einer hohen therapeutischen Erfolgswahrscheinlichkeit einhergeht. Als intermediär gegen ein Antimykotikum gilt ein *Candida* Isolat dann, wenn es in vitro von einer Konzentration gehemmt wird, welche mit einem unsicheren therapeutischen Ergebnis einhergeht. Als resistent gegen ein Antimykotikum gilt ein *Candida* Isolat dann, wenn seine MHK so hoch ist, dass auch bei der Anwendung der zugelassenen Höchstdosierung kein therapeutischer Erfolg zu erwarten ist.

1.7 Fragestellung

Aufgrund des zunehmenden Vorkommens invasiver Pilzinfektionen und damit einhergehendem zunehmendem Gebrauch von klassischen sowie neueren Antimykotika besteht die Notwendigkeit einer standardisierten sowie repro-

duzierbaren antimykotischen Empfindlichkeitsprüfung. Einige nicht automatisierte Verfahren zur Resistenztestung von Pilzen sind kommerziell erhältlich und auch in ihrer Verlässlichkeit wissenschaftlich geprüft, allerdings gilt ihre Durchführung als langwierig und mühsam. Eine weitgehend automatisierte Empfindlichkeitsprüfung soll nun das VITEK 2 Mikrobiologie System ermöglichen, welches viele kritische Parameter der Resistenztestung standardisiert. Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit besteht in der Evaluierung der Resistenztestung durch das VITEK 2 System. Dieses wurde hierfür mit der CLSI Referenzmethode mittels Mikrobouillondilution im standardisierten Verfahren anhand von 510 *Candida*-Stämmen verglichen. Bei den in diesem Rahmen verwendeten Antimykotika handelte es sich um Amphotericin B, Fluconazol, Voriconazol und 5-Fluorocytosin.

Weil, wie schon oben beschrieben, die invasive Candidiasis ein zunehmendes Problem darstellt, ist es außerdem wichtig, der Epidemiologie der *Candida* Spezies sowie der Entwicklung antimykotischer Resistenzen weiter nachzugehen. Somit gelten als weitere Ziele dieser Arbeit die Klärung der Epidemiologie der im Zeitraum vom 1. Dezember 1997 bis zum 31. Mai 2006 im Rahmen der SCOPE Studie gesammelten *Candida* Isolate sowie die Erhebung der Resistenzlage von 510 ausgewählten sowie empfindlichkeitsgeprüften *Candida*-Stämmen.

2. Material und Methoden

2.1 Beschreibung des untersuchten Stammkollektivs

Von Dezember 1997 bis Mai 2006 wurden *Candida* Isolate gesammelt, welche von Patienten aus 52 Krankenhäusern unterschiedlicher Größe und geographischer Verteilung in den USA stammten. Diese Krankenhäuser wurden ausgewählt im Rahmen des weiter oben beschriebenen SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance) Projektes.

Alle *Candida*-Stämme stellten Isolate aus Blutkulturen dar. Hierbei handelte es sich um Blutkulturen von nosokomial, also frühestens 48 h nach Krankenhausaufnahme erworbenen Blutstrominfektionen.

2.2 Lagerung und Kultivierung der Stämme

Die an dem SCOPE Projekt teilnehmenden Krankenhäuser bewahrten die patientenspezifischen Isolate in Schrägagar auf. Monatlich wurden diese dann zusammen mit einem zugehörigen Case-Report zu dem Studienzentrum am Medical College of Virginia Hospitals, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA geschickt. Die Isolate wurden hier bei -70°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Im Rahmen unterschiedlicher Projekte im Mikrobiologischen Labor der Universität Iowa, der Abteilung für Epidemiologie der Virginia Commonwealth Universität und des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität zu Köln (IMMIH) wurden die Isolate weiter charakterisiert, indem Vergleichsmessungen, erneute Identifizierungen und Empfindlichkeitstestungen vorgenommen wurden.

Die an das IMMIH gesendeten Pilz-Isolate wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit von den gelieferten Tupfern auf Chromagar ausgestrichen und angezchtet - diese Kulturen wurden anschließend in Trypton-Soja-Bouillon mit 20% Glycerin überführt und bei -70°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

2.3 Identifizierung der *Candida* Spezies

2.3.1 Identifizierung mittels Chromagar durch ein Farbindikatorprinzip

Für die Identifizierung der unterschiedlichen *Candida* Spezies wurden zunächst CHROM-Agar-Platten verwendet, welche in der Nährbodenabteilung des IMMIH gegossen wurden (Trockenmedium der Firma Mast Diagnostika: 15 g/L Agar, 10,2 g/L Pepton, 22 g/L chromogener Mix, 0,5 g/L Chloramphenicol; pH 6,1 +/- 0,2). Zur Subkultivierung der eingefrorenen *Candida* Isolate wurde die Glycerin-Bouillon zunächst aufgetaut und anschließend mittels Dreiösenausstrich auf CHROM-Agar-Platten ausgestrichen und dann über 48 h bei 36 ° C inkubiert.

Auf CHROM-Agar-Platten können *C. albicans/C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. glabrata* und *C. tropicalis* aufgrund ihrer Pigmentbildung voneinander unterschieden werden. Durch Reaktionen von speziesspezifischen Enzymen mit dem chromogenen Substrat kommt es zu einem Wachstum von unterschiedlicher Farbe. Aus diesem Grund wächst *C. albicans/C. dubliniensis* als grüne, *C. glabrata* als lila, *C. krusei* als rosa und *C. tropicalis* als blaue Kolonien. Außerdem zeigt sich bei den Kolonien eine unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit. Diese erscheint bei *C. albicans/C. dubliniensis* und bei *C. glabrata* glatt, bei *C. krusei* rau und bei *C. tropicalis* rau oder glatt.

Einige der eigentlich als Reinkultur versandten Stämme erwiesen sich nach Subkultivierung als ein Gemisch mehrerer Spezies, welche nochmals isoliert und separat weiter bearbeitet wurden. Einige der Spezies, wie z.B. *C. parapsilosis* und *C. famata*, werden auf CHROM-Agar-Platten zwar nicht in ihrem Wachstum gehemmt, können aber aufgrund der gleichen weißlichen Färbung ihrer Kolonien nicht eindeutig voneinander diskriminiert werden. In solchen Fällen wurde auf die weiter unten beschriebene Identifizierungsmethode des VITEK 2 Systems zurückgegriffen. Ebenso wenig konnten *C. albicans* und *C. dubliniensis* voneinander unterschieden werden, denn beide Spezies bilden grüne Kolonien auf Chromagar. Aus diesem Grund wurden später 120 Stichproben von den insgesamt 656 auf Grund ihrer Farbe als *C. albicans* identifizierten Isolate nochmals mit Hilfe des VITEK 2 Systems identifiziert, um den prozentualen Anteil von *C. dubliniensis* an allen in Form grüner Kolonien gewachsenen Stämme errechnen zu können.

2.3.2 Identifizierung mittels semiautomatisiertem Verfahren (VITEK 2)

2.3.2.1 Beschreibung des VITEK 2 Mikrobiologie Systems und der VITEK 2-YST-Identifizierungskarte

Das VITEK 2 Mikrobiologie System der Firma bioMérieux stellt ein System für die schnelle Identifizierung und Empfindlichkeitstestung von Mikroorganismen dar. Diesbezügliche Arbeitsschritte sollen durch den Einsatz dieses Systems in Laboratorien vereinfacht, verbessert und standardisiert werden.

Das zugehörige VITEK® 2-Gerät beinhaltet unter anderem ein semiautomatisiertes Identifizierungssystem für Pilze, welches im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit in Anspruch genommen wurde. Die visuell mittels Farbindikatorprinzip nicht eindeutig identifizierbaren Stämme wurden hiermit weitergehend untersucht. Neben diesem semiautomatisierten Pilzidentifizierungssystem wurde außerdem ein System zur Resistenzbestimmung gegenüber Antimykotika entwickelt, welches, wie unter 2.4.2 beschrieben, eingesetzt und überprüft wurde.

Für den Einsatz des Mikrobiologie Systems werden verschiedene Komponenten benötigt: das VITEK® 2-Gerät, die Smart Carrier Station (SCS), Testkarten für die Identifizierung bzw. Resistenzbestimmung der untersuchten Erreger, der VITEK® 2 DENSICHEK, die VITEK® 2-Systemsoftware sowie eine Analysesoftware (Expertsystem) zur Auswertung der Ergebnisse (AES) [9].

a) VITEK® 2-Gerät

Das VITEK® 2-Gerät stellt die Hardware zur Probenverarbeitung, dem Kartentransport sowie Analyse und Messung der Testkarten dar. Die Testkarten werden mit Hilfe eines Transportsystems zu unterschiedlichen Stationen in der Verarbeitungs- und Analyseeinheit bewegt [9].

Nach der Beladung des VITEK® 2-Gerätes mit einem Carrier (dem Träger für Teströhrchen und Testkarten) wird dieser mittels eines Kunststoffträgers, einem sogenannten Transportschlitten, von einer zur nächsten Verarbeitungseinheit durch das Gerät befördert. Diese Verarbeitungseinheiten werden im Folgenden nacheinander genauer beschrieben:

1. Die erste Station stellt eine Barcodeleseeinheit dar - hier wird der auf die VITEK® 2-Testkarten gedruckte Barcode gelesen. Dieser Code enthält Informationen bezüglich Testkartentyp, Verfallsdatum, Chargennummer (welche Aufschluss über

das Herstellungsdatum gibt) und Sequenznummer (welche zur eindeutigen Identifizierung der Testkarte dient). Mit Hilfe eines Memory Chip-Lesers werden die von der Smart Carrier Station in den Memory Chip des Carriers gespeicherten Daten gelesen und mit denjenigen Informationen verglichen, die das VITEK® 2-Gerät selbst über den eigenen Barcodeleser erhalten hat. Somit kann überprüft werden, ob die Positionen der Karten im Carrier beibehalten wurden. Außerdem werden die Daten, die an der Smart Carrier Station eingegeben wurden, an den gerätezugehörigen Computer weitervermittelt.

2. In der Dispenser/Pipettiereinheit erfolgt die Vorbereitung der Proben. Es wird sichergestellt, dass zusammengehörige Identifizierungs- und Resistenzkarten später mit derselben Keimsuspension befüllt werden: Durch die Pipettiereinheit wird eine eingestellte Menge der Keimsuspension vom Teströhrchen der Identifizierungskarte, welches manuell befüllt wurde, in das daneben platzierte Röhrchen der Resistenzkarte, welches ohne Suspension in den Carrier gestellt wurde, befördert. Das Dispensersystem befüllt das Teströhrchen der zugehörigen Resistenzkarte zusätzlich zuvor mit steriler Kochsalzlösung, so dass sich in diesem Röhrchen eine Mischung ergibt.

3. Die endgültige Beimpfung der Testkarten erfolgt in der sogenannten Fülleinheit. Durch das Erzeugen und anschließendes Lösen eines Vakuums in einer speziellen Kammer des Gerätes entsteht ein zunehmender Luftdruck. Dieser drückt die Keimsuspension durch einen Transferschlauch aus den Teströhrchen in die Testkarten.

4. Dieser Transferschlauch wird anschließend in der Versiegelungseinheit durch Hitze abgetrennt und verschlossen, so dass jede Testkarte abgedichtet ist.

5. Anschließend folgt das Inkubieren und Lesen der Karten. Dafür werden die Karten in ein Karussell befördert und bei 35,5 ° C inkubiert, die Lesung der Karten erfolgt dabei alle 15 Minuten in einer geeigneten Lese-Position. Dies geschieht einerseits durch eine Transmissionsoptik: Es erfolgt ein direkter Rückschluss von der Menge des durchscheinenden Lichtes durch eine Kavität der Karte auf die Menge des dortigen Keimwachstums. Je stärker das Wachstum, desto weniger intensiv das transmittierte Licht. Hierfür werden lichtemittierende Dioden verwendet, die Licht einer geeigneten Wellenlänge erzeugen. Aufgefangen wird das Licht von Silizium-Photozellendetektoren. Andererseits ermöglicht eine Fluoreszenzoptik zusätzlich die

Überwachung der Enzymaktivität: diese kann direkt anhand der bekannten biochemischen Nebenprodukte eines Mikroorganismus bestimmt werden [7].

b) Smart Carrier Station

Bei der Smart Carrier Station (SCS) handelt es sich um einen kleinen Computer, der Informationen über die Proben und Testkarten erfasst und diese dann anschließend an das VITEK® 2-Gerät übermittelt. Hierfür wird die Smart Carrier Station mit einem Carrier bestückt: Der Carrier stellt den Träger für die Testkarten und die dazugehörigen Suspensionsröhrchen gefüllt mit Keimsuspension dar und kann mit maximal je 15 von diesen Materialien bestückt werden. Die Informationeneingabe in die Smart Carrier Station erfolgt sowohl über die SCS-Tastatur (Information über die Probe) als auch über den SCS-Barcodescanner (Information über die Testkarte). Diese eingegebenen Informationen können nun von der Smart Carrier Station an das VITEK® 2-Gerät über einen Memory Chip übermittelt werden, welcher wiederum Bestandteil des Carriers ist [7].

c) VITEK® 2-YST-Identifizierungskarte

Die VITEK® 2-Hefe-Identifizierungskarte (YST) wurde entwickelt zur automatischen Identifizierung von klinisch relevanten Hefen und hefeähnlichen Pilzen. Neben unterschiedlichen Spezies der Gattung *Candida* können somit auch Pilze wie z.B. Kryptokokken, *Trichosporo* spp. und viele weitere identifiziert werden.

Etwa 18 Stunden nach Bestückung des VITEK® 2-Gerätes sind die Endergebnisse verfügbar, welche sich aus 46 biochemischen Tests ergeben. Bei diesen wird die Verwertung von Kohlenstoff und Stickstoff bestimmt und desweiteren werden enzymatische Aktivitäten gemessen [8].

d) VITEK® 2 DENSICHEK, VITEK® 2-Systemsoftware und Analysesoftware

Mit der Hilfe des VITEK® 2 DENSICHEKs kann die Konzentration der hergestellten Keimsuspension bestimmt werden, so dass dem VITEK® 2-Gerät eine standardisierte Dichte der Suspension vorgelegt werden kann.

Die VITEK® 2-Systemsoftware ist zuständig für die Auswertung der quantitativen Messungen der Identifizierung und Resistenzbestimmung. Die Analysesoftware hilft durch Vergleiche mit einer Datenbasis bei der Validierung und Auswertung der Ergebnisse [9].

2.3.2.2 Untersuchungsablauf

Die Speziesdifferenzierung durch das VITEK® 2-Gerät wurde bei denjenigen Stämmen vorgenommen, welche nicht mittels Farbindikatorprinzip eindeutig identifiziert werden konnten. Außerdem geschah dies bei einer Stichprobe von den auf Grund ihrer Farbe vorerst als *C. albicans* identifizierten Isolaten, um wie weiter oben erläutert den prozentualen Anteil von *C. dubliniensis* festlegen zu können.

Die Stämme wurden zunächst auf Sabouraud-Agar-Platten gebracht und bei 36 ° C 24 h lang inkubiert. Mit einem sterilen Tupfer wurden anschließend morphologisch ähnlich aussehende Kolonien in 3 ml steriler Kochsalzlösung (0,45 %) suspendiert und mit Hilfe eines Vortex-Genie® 2 Schüttelgerätes homogenisiert. Dabei wurde auf eine Dichte entsprechend derjenigen des Trübungsstandards (McFarland) 1,80 bis 2,20 geachtet und für diese Einstellung ein VITEK® 2 DENSICHEK Dichtemessgerät eingesetzt. Die angefertigten Suspensionsröhrchen sowie die VITEK® 2-Hefe-Identifizierungskarten wurden in einen Träger (Carrier) gestellt, dieser wiederum in die Smart Carrier Station. Anschließend, nach Dateneingabe, wurde der Carrier in das VITEK® 2-Gerät gestellt, in dem dann die Karten und Suspensionen (wie unter 2.3.2 beschrieben) weiter verarbeitet und ausgewertet wurden. Für jedes untersuchte *Candida* Isolat wurde zur Kontrolle ein Viertel einer CHROM-Agar-Platte beimpft, um die Reinheit der Stämme zu kontrollieren.

2.3.3 Identifizierung mittels Assimilationsreaktionen (API ID 32C)

Diejenigen Stämme, welche weder makroskopisch noch mit Hilfe des VITEK® 2-Gerätes eindeutig identifiziert werden konnten, wurden mittels API ID 32C (bioMerieux® SA, Marcy-l'Etoile, France) identifiziert. Hierbei handelt es sich um ein standardisiertes, miniaturisiertes System zur Identifizierung von Hefen anhand von 32 Assimilationsreaktionen und einer Datenbasis. Dafür werden spezielle Teststreifen verwendet, welche je 32 Vertiefungen besitzen, in denen sich verschiedene Kohlenhydrate in dehydratisierter Form befinden.

Die zu testenden Isolate wurden erneut auf Sabouraud-Agar bei 36 ° C 24 h lang bebrütet. Anschließend wurden eine oder mehrere morphologisch gleiche Kolonien mittels eines sterilen Tupfers vom Kulturmedium abgenommen. Mit diesem Material sowie mit 2 ml destilliertem Wasser wurde eine Keimsuspension hergestellt. Die Trübung der Suspension wurde mit einem Trübungsstandard (McFarland) verglichen,

so dass eine Dichte von McFarland 2 erreicht wurde. 250 µl dieser Keimsuspension wurden mit 7 ml API C Medium (5 g Ammoniumsulfat, 0,31 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,45 g Dikaliumhydrogenphosphat, 0,92 g Dinatriumphosphat, 0,1 g Natriumchlorid, 0,05 g Calciumchlorid, 0,2 g Magnesiumsulfat, 0,005 g L-Histidin, 0,02 g L-Tryptophan, 0,02 g L-Methionin, 0,5 g Geliermittel, 1 ml Vitaminlösung, 10 ml Spurenelemente, ad 1000 ml destilliertes Wasser, pH-Wert: 6,4-6,8 bei 20-25 ° C) vermischt.

Die Teststreifen wurden manuell mit einer elektronischen Pipette beimpft, in jede Vertiefung wurden 135 µl pipettiert. Anschließend wurden die Streifen in einem feuchtgehaltenem Behälter bei 30 ° C für 48 h inkubiert.

Die Ablesung erfolgte visuell: alle Kammern wurden mit einer Wachstumskontrolle verglichen. Jede Trübung, die sich stärker darstellte als die Kontrolle, zeigte eine Substratassimilation an und wurde als positiv gewertet. Es erfolgte eine Codierung mittels Profil-Index. Die Codenummern konnten mit Hilfe einer Identifizierungssoftware (apiweb™) weiter interpretiert und einer bestimmten Spezies zugeordnet werden.

2.4 Resistenzbestimmung der *Candida* Spezies

510 von den insgesamt 1356 Isolaten wurden ausgewählt und mittels der standardisierten Mikrobouillondilution (CLSI Referenzmethode) und des VITEK 2 Systems resistenzgetestet. Im Hinblick auf die Auswahl dieser Isolate wurden jeder dritte Stamm der Spezies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis*, sowie alle Stämme der seltener vertretenen Spezies miteinbezogen.

2.4.1 Resistenzbestimmung mittels standardisierter Mikrobouillondilution (CLSI Referenzmethode)

2.4.1.1 Das Prinzip der Mikrobouillondilutionsmethode

Die in vitro Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern ist für den gezielten Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen sowie für ein aussagekräftiges Resistenzmonitoring maßgeblich. Die Ermittlung von Daten in Form von minimalen Hemmkonzentrationen (MHK-Werten) mittels Mikrobouillondilution wird hierfür als

verlässliche Methode und somit als Standardverfahren angesehen. Das Prinzip dieser Methode wird im Folgenden erläutert:

Das zu untersuchende Pilz-Isolat wird in einer Bouillon suspendiert. Diese Keimsuspension wird anschließend in eine mit verschiedenen Konzentrationen von Antimykotika beschichtete Testplatte gegeben. Nach Bebrütung über einen festgegebenen Zeitraum kann das Wachstum der Pilze in den einzelnen Vertiefungen abgelesen und darüber die minimale Hemmkonzentration (MHK) für die einzelnen Antimykotika bestimmt werden.

Die MHK beschreibt die niedrigste Wirkstoffkonzentration einer antimikrobiellen Substanz, bei der die Vermehrung eines Mikroorganismus noch gehemmt wird. Durch die Bestimmung der MHK lassen sich Aussagen über die Wirksamkeit eines Medikamentes sowie die Resistenz eines bestimmten Erregers machen.

Die Mikrobouillondilutionsmethode erlaubt somit quantitative Aussagen zu der Empfindlichkeit von Pilz-Isolaten gegenüber bestimmten Antimykotika. Mit dem Standard M27-A2 (2002) wurde durch das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), vormals National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), eine international anerkannte Durchführungsvorschrift vorgegeben, mit deren Hilfe die Mikrobouillondilutionsmethode für Hefen angewendet und interpretiert werden kann.

2.4.1.2 Untersuchungsablauf

Durchgeführt wurde die Mikrobouillondilutionsmethode entsprechend dem NCCLS (National Committee for Clinical and Laboratory Standards) Dokument M27–A2 [15].

a) Mikrotitrationsplatten

Die verwendeten vorbeschichteten Testplatten waren Mikrotitrationsplatten (MIKRONAUT-AM) der Firma Merlin®. Ihre Formation ermöglichte die Empfindlichkeitsprüfung gegenüber den folgenden 8 Antimykotika:

Amphotericin B (APH; getesteter Konzentrationsbereich: 0,031-32 mg/l),

5-Fluorocytosin (FCY; getesteter Konzentrationsbereich: 0,031-64 mg/l),

Fluconazol (FCA; getesteter Konzentrationsbereich: 0,063-128 mg/l),

Voriconazol (VOR; getesteter Konzentrationsbereich: 0,004-8 mg/l),

Posaconazol (POS; getesteter Konzentrationsbereich: 0,004-8 mg/l),

Micafungin (MIF; getesteter Konzentrationsbereich: 0,004-8 mg/l),

Anidulafungin (ANF; getesteter Konzentrationsbereich: 0,004-8 mg/l),
Caspofungin (CAS; getesteter Konzentrationsbereich: 0,004-8 mg/l).

b) Bouillon

Zubereitet wurde das verwendete Medium in der Nährbodenabteilung des IMMIH. Hierfür wurde 10,4 g pulverisiertes RPMI 1640 Medium (R-6504 der Firma Sigma-Aldrich®) vollständig in 900 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Dann wurden 34,53 g MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure (Firma Merck®) eingerührt und unter Zugabe von 10 Mol NaOH wurde ein pH-Wert von 6,9- 7,0 eingestellt. Anschließend wurden 18 g D(+) Glucose-Monohydrat (Firma Merck®) zugefügt und aufgelöst. Danach wurde das Medium durch Zugabe von destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt und mittels Membranfiltration sterilisiert.

c) Aufbereitung der Stämme und Herstellung einer Verdünnungsreihe

Die eingefrorenen Pilzkulturen wurden zunächst mittels Dreißenausstrich auf Chromagar aufgebracht und 24 h lang bei 35 ° C inkubiert. Somit konnte die Reinheit der Stämme nochmals überprüft werden. Anschließend erfolgte eine Überimpfung auf Sabouraudagar und eine weitere Bebrütung bei 35 ° C für 24 h.

Für das Zubereiten einer Keimsuspension wurden nachfolgend ca. 3-4 Kolonien in 4 ml NaCl 0,9% überführt und eine Trübung von 0,5 McFarland hergestellt, was ca. einer Keimzahl von 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen pro ml entspricht. Von dieser Suspension wurden nun 200 µl in 4 ml RPMI Medium pipettiert und mittels eines Vortex-Genie® 2 Schüttelgerätes homogenisiert – diese Mixtur entsprach einer Verdünnung von 1:20. Um eine nochmalige Verdünnung von 1:50 zu erreichen, wurden aus dieser Mixtur wiederum 400 µl in 22 ml RPMI Medium pipettiert und homogenisiert, so dass sich eine 1000-fache Verdünnung und eine Endkonzentration von ca. $1-5 \times 10^3$ KBE (koloniebildenden Einheiten)/ml ergab.

d) Aufbereitung und Ablesung der Mikrotitrationsplatten

Von dieser fertigen Suspension wurden jeweils 200 µl mit einer Mehrkanalpipette in die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte überführt. Anschließend wurde die Mikrotitrationsplatte mit einer Abklebefolie verschlossen und bei 36 ° C bebrütet, je nach Spezies 24-48 h lang.

Die visuelle Ablesung der Testplatten, die mit der Hilfe eines Spiegels durchgeführt wurde, erfolgte gemäß dem NCCLS M27-A2 Dokument sowie der Tabelle 5 und Appendix C des Dokumentes. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde für Amphotericin B festgelegt als die niedrigste Konzentration der Substanz, bei der kein sichtbares Wachstum mehr festzustellen war. Für die übrigen getesteten Substanzen galt die MHK als eine 50%ige Reduktion des Wachstums im Vergleich zu einer Wachstumskontrolle, welche Antimykotika-frei war.

2.4.2 Resistenzbestimmung mittels semiautomatisiertem Verfahren (VITEK 2)

2.4.2.1 Beschreibung des VITEK 2 Mikrobiologie Systems und der VITEK 2-Resistenzkarte für Hefen

Für die Resistenzbestimmung wurde wie auch für die Identifizierung der Pilze das in Kapitel 2.3.2.1 genauer beschriebene VITEK 2 Mikrobiologie System inklusive VITEK® 2-Gerät verwendet.

Die Testung des Resistenzverhaltens konzentriert sich auf die Bestimmung der MHK, also die niedrigste Konzentration eines Antimykotikums, bei der das Wachstum gehemmt wird. Den MHK-Ergebnissen kann dann anschließend eine Interpretation (sensibel, intermediär, resistent) zugeordnet werden, um so theoretisch eine Hilfestellung für eine Therapie zu geben. Für diese Zuordnung der MHK-Werte erfolgt eine Orientierung an standardisierten Grenzwerten (Breakpoints), die für die einzelnen Antimykotika unterschiedlich festgelegt sind.

Bei der VITEK® 2-Resistenzkarte für Hefen (AST-YS01; Referenznummer: 22 108) handelt es sich um eine verkürzte, miniaturisierte Version der geometrischen Verdünnungsreihe für die MHK-Bestimmung mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode. Sie enthält 64 Nöpfchen: eine Wachstumskontrolle sowie genau bemessene Mengen spezifischer Antimykotika und des Kulturmediums. Zu den vorgegebenen Antimykotika gehören Amphotericin B, Fluconazol, 5-Fluorocytosin und Voriconazol. Das Wachstum in den einzelnen Nöpfchen der Karte wird bei Hefen bis zu 36 h lang gemessen, anschließend werden die Testergebnisse in Form von MHK-Werten für jedes auf der Karte enthaltene Antimykotikum angegeben [8].

2.4.2.2 Untersuchungsablauf

Die Vorbereitung der Stämme und die Herstellung der Keimsuspension erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben. Die Bestückung des Trägers (Carriers) gestaltete sich folgendermaßen: An zwei aufeinanderfolgenden Positionen des Carriers wurde zuerst je ein mit Keimsuspension befülltes Teströhrchen platziert, an der darauf folgenden Position ein leeres Röhrchen mit einer VITEK® 2-Resistenzkarte für Hefen. Falls noch eine Identifizierung ausstand, wurde an der ersten Position zusätzlich eine VITEK® 2-YST-Identifizierungskarte positioniert. Der Carrier wurde in die Smart Carrier Station gestellt und anschließend, nach Dateneingabe, dann in das VITEK® 2-Gerät, in dem wiederum die Karten und Suspensionen, wie unter 2.3.2 beschrieben, weiter verarbeitet und ausgewertet wurden. Die Lagerung der VITEK® 2-Resistenzkarte für Hefen erfolgte wie auch für die Identifizierungskarten in Schutzfolien bei 4 ° C.

Für die Evaluierung der Empfindlichkeitsprüfung mittels des VITEK 2 Systems werden kategorielle sowie essentielle Übereinstimmungen mit der CLSI Referenzmethode ermittelt. Die kategorielle Übereinstimmung beschreibt den prozentualen Anteil aller Isolate, welcher mittels beider Methoden getestet denselben Kategorien (sensibel, intermediär, resistent) angehört. Die essentielle Übereinstimmung definiert den prozentualen Anteil der Isolate, der, mittels beider Methoden getestet, innerhalb von zwei MHK-Wert Abstufungen liegt. Desweiteren erfolgte eine Definition von Fehlern, wobei große Fehler (major error) von kleinen Fehlern (minor error) unterschieden wurden. Eine Abweichung von zwei MHK-Stufen wurde als kleiner Fehler und eine Abweichung von drei oder mehr MHK-Stufen als großer Fehler gewertet. Eine weitere Form der Fehlerdefinition, welche auch in der gängigen Literatur vermehrt angewandt wird, orientiert sich an der Übereinstimmung der Kategorien sensibel, intermediär und resistent. Um vorliegenden Daten besser mit der Literatur vergleichen zu können, wurde auch diese Fehlereinteilung angewandt. Falls *Candida* Isolate durch das VITEK 2 System als sensibel und gleichzeitig durch die CLSI Referenzmethode als resistent getestet wurden, galt das als sehr großer Fehler (very major error). Der umgekehrte Fall wurde als großer Fehler (major error) bezeichnet. Alle übrigen Zustände, also falls eine der beiden Methoden das Ergebnis sensibel oder resistent herausgab, während die andere

Methode das Ergebnis intermediär anzeigte, wurden als kleine Fehler (minor error) gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Speziesverteilung

Die für die vorliegende Arbeit zugrunde liegende Stammsammlung umfasst 1411 *Candida* Isolate. Von diesen wuchsen 55 Stämme bei der Subkultivierung nicht auf Agar an und konnten daher für weitere Testungen nicht verwendet werden. Die übrigen 1356 Stämme wurden zunächst mittels Chromagar identifiziert - bei den hierdurch nicht eindeutig auf Speziesebene identifizierbaren Stämmen wurde das semiautomatisierte Identifizierungssystem (VITEK 2) eingesetzt. Falls auch hierbei keine eindeutige Identifizierung erreicht werden konnte, wurde als weitere Identifizierungsmethode die Assimilationsmethode (API ID 32 C) eingesetzt.

In 651 Fällen (48,0%) wurde *C. albicans* identifiziert: Von den insgesamt 656 auf Grund ihrer Farbe vorerst als *C. albicans* identifizierten Isolaten wurden 120 Stichproben nochmals mit Hilfe des VITEK 2 Systems identifiziert, um den prozentualen Anteil von *C. dubliniensis* an allen in Form grüner Kolonien gewachsenen Stämme ermitteln zu können. Hierbei fand sich ein *C. dubliniensis* Isolat, hochgerechnet entspricht das 5 Isolaten dieser Spezies. Die Spezies *C. parapsilosis* wurde 254mal (18,7%) nachgewiesen. In 222 Fällen (16,4%) wurde die Spezies *C. glabrata*, in 152 Fällen (11,2%) *C. tropicalis* isoliert. Die Spezies *C. lusitaniae* wurde 29mal (2,1%), die Spezies *C. krusei* 21mal (1,5%) nachgewiesen. Alle übrigen Spezies machten jeweils einen Anteil von weniger als 1% aus und sind ebenfalls in Form von Anzahl und Prozent in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Speziesverteilung

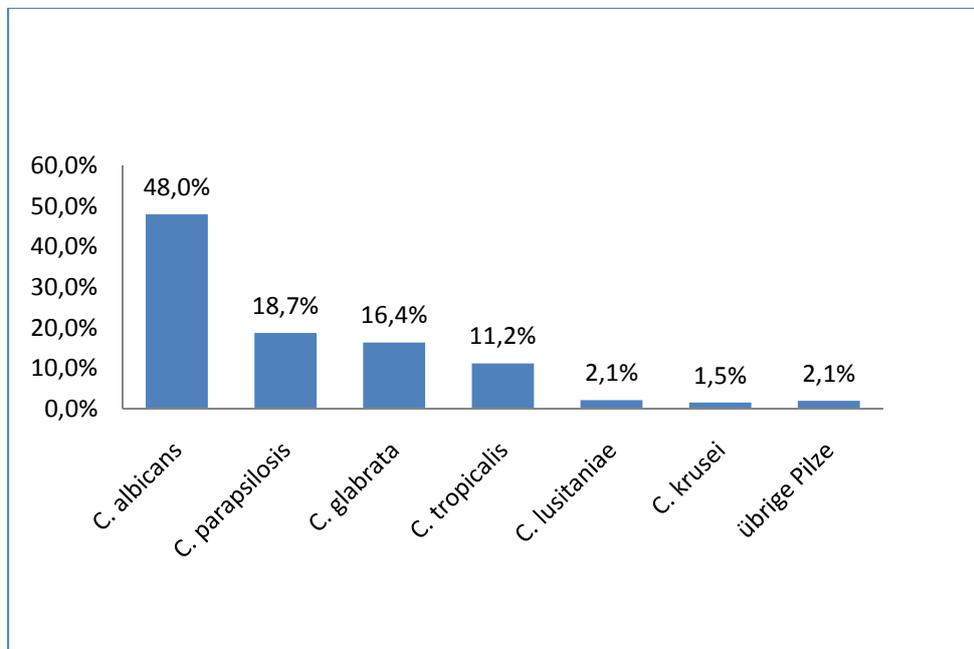
Spezies	Anzahl	Prozent
<i>C. albicans</i> ¹	651	48,0%
<i>C. parapsilosis</i>	254	18,7%
<i>C. glabrata</i>	222	16,4%
<i>C. tropicalis</i>	152	11,2%
<i>C. lusitaniae</i>	29	2,1%
<i>C. krusei</i>	21	1,5%
<i>Debaryomyces etchellsii</i> / <i>carsonii</i> ²	9	0,7%
<i>C. famata</i>	4	0,3%
<i>C. sake</i>	2	0,1%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	0,1%

Spezies	Anzahl	Prozent
<i>C. dubliniensis</i> ¹	5	0,4%
<i>C. guilliermondii</i>	1	0,1%
<i>C. norvegensis</i>	1	0,1%
<i>C. rugosa</i>	1	0,1%
<i>Malassezia furfur</i>	1	0,1%
<i>Trichosporon asahii</i>	1	0,1%
Gesamt	1356	100,0%

¹= geschätzter Anteil von *C. dubliniensis* und *C. albicans* wie im Text erläutert

²= Identifizierung auf Speziesebene mittels Assimilationsreaktionen (API ID 32C) nicht eindeutiger möglich

Abbildung 3.1: Speziesverteilung



3.2 Übersicht über die resistenzgetesteten *Candida* Isolate

Von den 1356 identifizierten Stämmen wurden 510 Isolate ausgewählt und auf ihre Resistenz gegenüber mehreren Antimykotika getestet. Hierfür wurde jeder dritte Stamm der häufig vertretenen Spezies (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*) ausgewählt. Die weniger häufig vertretenen Spezies wurden komplett getestet, das heißt alle von diesen Spezies vorhandene Isolate. Bei der Spezies *C. dubliniensis*, bei der der Gesamtanteil nur geschätzt wurde, wurde das einzige eindeutig mittels VITEK 2 System identifizierte Isolat getestet.

Tabelle 3.2: Übersicht der resistenzgetesteten Stämme

Spezies	Anzahl	Prozent
<i>C. albicans</i>	225	44,1%
<i>C. parapsilosis</i>	88	17,3%
<i>C. glabrata</i>	73	14,3%
<i>C. tropicalis</i>	51	10,0%
<i>C. lusitaniae</i>	29	5,7%
<i>C. krusei</i>	21	4,1%
<i>Debaryomyces etchellsii / carsonii</i> ²	9	1,8%
<i>C. famata</i>	4	0,8%
<i>C. sake</i>	2	0,4%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	0,4%
<i>C. dubliniensis</i>	1	0,2%
<i>C. guilliermondii</i>	1	0,2%
<i>C. norvegensis</i>	1	0,2%
<i>C. rugosa</i>	1	0,2%
<i>Malassezia furfur</i>	1	0,2%
<i>Trichosporon asahii</i>	1	0,2%
Gesamt	510	100,0%

2= Identifizierung auf Speziesebene mittels Assimilationsreaktionen (API ID 32C) nicht eindeutiger möglich

3.3 Resistenztestung gegenüber den 4 Antimykotika Amphotericin B, Fluconazol, Voriconazol und 5-Fluorocytosin

Die Resistenztestung wurde einerseits mittels Mikrobouillondilution im standardisierten Verfahren (CLSI Referenzmethode) und andererseits mittels eines semiautomatisierten Verfahrens (VITEK 2) vorgenommen. Die Mikrobouillondilutionsmethode wurde durchgeführt entsprechend dem NCCLS (National Committee for Clinical and Laboratory Standards) Dokument M27–A2. Hierbei wurde für jedes Antimykotikum die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Die MHK-Werte konnten anschließend den Kategorien sensibel, intermediär und resistent zugeordnet werden. Für diese kategorielle Zuordnung der MHK-Werte erfolgte eine Orientierung an vom CLSI vorgegebenen Grenzwerten. Bei der Empfindlichkeitsprüfung mittels des VITEK 2 Systems wurde nach den Anweisungen des Herstellers vorgegangen. Die verwendeten Mikrotitrationsplatten sowie die Testkarten des VITEK 2 Systems ermöglichten die Resistenztestung gegenüber den 4 Antimykotika Amphotericin B, Fluconazol, Voriconazol und 5-Fluorocytosin. Insgesamt wurden 510 Stämme mittels beider Verfahren getestet.

3.3.1 Empfindlichkeit gegenüber Amphotericin B (siehe Tabelle 3.3.1)

Die Spanne der MHK-Werte für Amphotericin B lag für beide Methoden zusammen betrachtet zwischen 0,125 und 2 ($\mu\text{g/ml}$).

Die mit Hilfe der Mikrobouillondilutionsmethode abgelesenen MHK-Werte befanden sich alle in einem Bereich von ≤ 1 ($\mu\text{g/ml}$): alle 510 (100,0%) mit dieser Methode getesteten Stämme waren somit als sensibel gegenüber Amphotericin B einzustufen. Von den 510 mit Hilfe des VITEK 2 Systems getesteten Isolaten wurden 506 (99,2%) als sensibel getestet. 4 Stämme (0,8%) wurden vom VITEK Gerät als nicht sensibel bewertet. In diesen 4 Fällen handelte es sich um die Spezies *C. krusei*.

Tabelle 3.3.1: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller *Candida* Isolate (n=510) gegenüber Amphotericin B

AMPHOTERICIN B					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,125	S	4	0,8		
$\leq 0,25$	S			147	28,8
0,25	S	65	12,7		
0,5	S	318	62,4	330	64,7
1	S	123	24,1	29	5,7
2	I			4	0,8
Gesamt		510	100,0	510	100,0

RIS: Kategorielle Bewertung als resistent, intermediär oder sensibel

3.3.2 Empfindlichkeit gegenüber 5-Fluorocytosin (siehe Tabelle 3.3.2)

Die Spanne der MHK-Werte für 5-Fluorocytosin lag für beide Methoden zusammen betrachtet zwischen $\leq 0,031$ und ≥ 128 ($\mu\text{g/ml}$).

Die MHK-Werte für 477 (93,5%) der 510 mittels Mikrobouillondilutionsmethode getesteten Isolate befanden sich in einem Bereich von ≤ 4 ($\mu\text{g/ml}$). Somit galten diese Isolate als sensibel gegenüber 5-Fluorocytosin. 21 Isolate (4,1%) wiesen MHK-Werte von 8 und 16 ($\mu\text{g/ml}$) auf und wurden als intermediär eingestuft. 12 Isolate (2,4%) wiesen MHK-Werte von ≥ 32 ($\mu\text{g/ml}$) auf und wurden als resistent eingestuft. Bei den resistenten Stämmen handelte es sich um 8 *C. albicans*, 2 *C. lusitaniae* und 2 *C. krusei* Stämme.

Von den mit Hilfe des VITEK 2 Systems getesteten Isolaten wurden 480 (94,1%) der Stämme als sensibel getestet. 21 Stämme (4,1%) wurden als intermediär, 9 Stämme (1,8%) als resistent gegenüber 5-Fluorocytosin eingestuft. Bei den resistenten Stämmen handelte es sich um die Spezies *C. albicans*.

Tabelle 3.3.2: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller *Candida* Isolate (n=510) gegenüber 5-Fluorocytosin

5-FLUOROCYTOSIN					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,031	S	43	8,4		
0,063	S	119	23,3		
0,125	S	167	32,7		
0,25	S	69	13,5		
0,5	S	42	8,2		
<=1	S			473	92,6
1	S	23	4,5		
2	S	6	1,2	6	1,2
4	S	8	1,6	1	0,2
8	I	3	0,6	8	1,6
16	I	18	3,5	13	2,5
32	R	2	0,4	5	1,0
64	R	1	0,2		
>=64	R			4	0,8
>=128	R	9	1,8		
Gesamt		510	100,0	510	100,0

RIS: Kategorielle Bewertung als resistent, intermediär oder sensibel

3.3.3 Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol (siehe Tabelle 3.3.3)

Die Spanne der MHK-Werte für Fluconazol lag für beide Methoden zusammen betrachtet zwischen <=0,063 und >=256 (µg/ml).

Die MHK-Werte für 467 (91,5%) der 510 mittels Mikrobouillondilutionsmethode getesteten Isolate befanden sich in einem Bereich von <=8 (µg/ml). Somit galten diese Isolate als sensibel gegenüber Fluconazol. 31 Isolate (6,1%) wiesen MHK-Werte zwischen >=16 und <=32 (µg/ml) auf und wurden als Dosis-abhängig sensibel eingestuft. 12 Isolate (2,4%) wiesen MHK-Werte von >=64(µg/ml) auf und wurden als

resistent eingestuft. Als resistent gegenüber Fluconazol erwiesen sich 9 Isolate der Spezies *C. glabrata* und 3 *C. krusei* Isolate.

Von den mit Hilfe des VITEK 2 Systems getesteten Isolaten wurden 472 (92,5%) der Stämme als sensibel getestet. 27 Stämme (5,3%) wurden als Dosis-abhängig sensibel, 11 Stämme (2,2%) als resistent gegenüber Fluconazol eingestuft. Als resistent gegenüber Fluconazol erwiesen sich 8 *C. glabrata* Stämme und jeweils ein *C. krusei*, ein *C. lusitaniae* und ein *C. guilliermondii* Stamm.

Tabelle 3.3.3: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller *Candida* Isolate (n=510) gegenüber Fluconazol

FLUCONAZOL					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,063	S	2	0,4		
0,125	S	38	7,5		
0,25	S	156	30,6		
0,5	S	144	28,2		
<=1	S			382	74,9
1	S	50	9,8		
2	S	17	3,3	24	4,7
4	S	25	4,9	24	4,7
8	S	35	6,9	42	8,2
16	I	16	3,1	22	4,3
32	I	15	2,9	5	1,0
64	R	8	1,6		
>=64	R			11	2,2
128	R	3	0,6		
>=256	R	1	0,2		
Gesamt		510	100,0	510	100,0

RIS: Kategorielle Bewertung als resistent, intermediär oder sensibel

3.3.4 Empfindlichkeit gegenüber Voriconazol (siehe Tabelle 3.3.4)

Die Spanne der MHK-Werte für Voriconazol lag für beide Methoden zusammen betrachtet zwischen <=0,004 und >=8 (µg/ml).

Die MHK-Werte für 499 (97,8%) der 510 mittels Mikrobouillondilutionsmethode getesteten Isolate befanden sich in einem Bereich von <=1 (µg/ml). Somit galten diese Isolate als sensibel gegenüber Voriconazol. 4 Isolate (0,8%) wiesen MHK-

Werte zwischen 1 und 4 ($\mu\text{g/ml}$) auf und wurden als Dosis-abhängig sensibel eingestuft. 7 Isolate (1,4%) wiesen MHK-Werte von ≥ 4 ($\mu\text{g/ml}$) auf und wurden als resistent eingestuft. Alle als resistent gegenüber Voriconazol eingestuften Isolate gehörten der Spezies *C. glabrata* an.

Von den mit Hilfe des VITEK 2 Systems getesteten Isolaten wurden 502 (98,4%) der Stämme als sensibel getestet. 3 Stämme (0,6%) wurden als intermediär, 3 Stämme (0,6%) als resistent gegenüber Voriconazol eingestuft. Bei den 3 resistenten Stämmen handelte es sich um Isolate der Spezies *C. glabrata*.

Bei 2 Stämmen (0,4%) wurde vom VITEK 2 System trotz mehrmaliger Versuche kein MHK-Wert herausgegeben. Bei diesen 2 Stämmen handelte es sich um *Cryptococcus neoformans* Isolate.

Tabelle 3.3.4: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller *Candida* Isolate (n=510) gegenüber Voriconazol

VORICONAZOL					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
$\leq 0,004$	S	6	1,2		
0,008	S	16	3,1		
0,016	S	180	35,3		
0,031	S	144	28,2		
0,063	S	49	9,6		
0,125	S	17	3,3	488	95,7
0,25	S	40	7,8	7	1,4
0,5	S	44	8,6		
1	S	3	0,6	7	1,4
2	I	4	0,8	3	0,6
4	R	5	1,0	2	0,4
8	R	2	0,4		
≥ 8	R			1	0,2
Kein Ergebnis				2	0,4
Gesamt		510	100,0	510	100,0

RIS: Kategorielle Bewertung als resistent, intermediär oder sensibel

3.4 Ergebnisse der Resistenztestung verschiedener *Candida* Spezies

3.4.1 Empfindlichkeit von *C. albicans* (siehe Tabelle 3.4.1)

Alle 225 getesteten Stämme der Spezies *C. albicans* erwiesen sich als sensibel gegenüber Amphotericin B. Dieses Ergebnis zeigte sich bei beiden Resistenzbestimmungsmethoden.

Bei den Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber 5-Fluorocytosin erwiesen sich mittels Mikrobouillondilutionsmethode 215 (95,6%) der Stämme als sensibel, 2 (0,9%) der Stämme als intermediär und 8 (3,5%) der Stämme als resistent. Getestet durch das VITEK 2 Verfahren wurden 216 (96,0%) der Stämme als sensibel und 9 (4,0%) als resistent gegenüber 5-Fluorocytosin befundet.

Bei den Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber Fluconazol erwiesen sich mittels Mikrobouillondilutionsmethode alle 255 Stämme (100,0%) als sensibel. Getestet durch das VITEK 2 Verfahren wurden 224 (99,6%) der Stämme als sensibel und 1 Stamm (0,4%) als Dosis-abhängig sensibel gegenüber Fluconazol befundet.

Bei den Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber Voriconazol erwiesen sich anhand beider Bestimmungsmethoden alle 225 Stämme (100,0%) als sensibel.

Tabelle 3.4.1: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller *C. albicans* Isolate (n=225)

<i>C. albicans</i>					
Amphotericin B					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,125	S	1	0,4		
<=0,25	S			43	19,1
0,25	S	26	11,6		
0,5	S	196	87,1	173	76,9
1	S	2	0,9	9	4,0
Gesamt		225	100,0	225	100,0

C. albicans

5-Fluorocytosin

		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,031	S	1	0,4		
0,063	S	22	9,8		
0,125	S	98	43,6		
0,25	S	24	10,7		
0,5	S	40	17,8		
<=1	S			213	94,7
1	S	23	10,2		
2	S	4	1,8	3	1,3
4	S	3	1,3		
8	I	2	0,9		
32	R			5	2,2
64	R	1	0,4		
>=64	R			4	1,8
>=128	R	7	3,1		
Gesamt		225	100,0	225	100,0

Fluconazol

		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,063	S	2	0,9		
0,125	S	36	16,0		
0,25	S	126	56,0		
0,5	S	58	25,8		
<=1	S			212	94,2
1	S	2	0,9		
2	S	1	0,4	5	2,2
4	S			5	2,2
8	S			2	0,9
16	I			1	0,4
Gesamt		225	100,0	225	100,0

Voriconazol

		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,004	S	6	2,7		
0,008	S	8	3,6		
0,016	S	139	61,8		
0,031	S	71	31,6		
0,063	S	1	0,4		
<=0,12	S			224	99,6
1	S			1	0,4
Gesamt		225	100,0	225	100,0

RIS: Kategorielle Bewertung als resistent, intermediär oder sensibel

3.4.2 Empfindlichkeit von *C. glabrata* (siehe Tabelle 3.4.2).

73 Stämme der Spezies *C. glabrata* wurden den Resistenztestungen mittels beider Methoden unterzogen.

Alle getesteten Stämme (100,0%) der Spezies *C. glabrata* erwiesen sich als sensibel gegenüber Amphotericin B. Dieses Ergebnis ergab sich durch beide Resistenzbestimmungsmethoden.

Bei den Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber 5-Fluorocytosin erwiesen sich sowohl mittels Mikrobouillondilutionsmethode als auch mittels des VITEK 2 Verfahren alle Stämme (100,0%) als sensibel.

Bei den Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber Fluconazol erwiesen sich mittels Mikrobouillondilutionsmethode 52 Stämme (71,2%) als sensibel, 12 (16,5%) der Stämme als Dosis-abhängig sensibel und 9 (12,3%) der Stämme als resistent. Getestet durch das VITEK 2 Verfahren wurden 51 (69,9%) der Stämme als sensibel, 14 (19,1%) der Stämme als Dosis-abhängig sensibel und 8 Stämme (11,0%) als resistent gegenüber Fluconazol befundet.

Bei der Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Voriconazol erwiesen sich mittels Mikrobouillondilutionsmethode 63 Stämme (86,4%) als sensibel, 3 (4,1%) der Stämme als intermediär und 7 (9,5%) der Stämme als resistent. Getestet durch das VITEK 2 Verfahren wurden 68 (93,2%) der Stämme als sensibel, 2 (2,7%) der Stämme als intermediär und 3 Stämme (4,1%) als resistent gegenüber Voriconazol befundet.

Tabelle 3.4.2: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller *C. glabrata* Isolate (n=73)

<i>C. glabrata</i>					
Amphotericin B					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,25	S			6	8,2
0,25	S	3	4,1		
0,5	S	37	50,7	53	72,6
1	S	33	45,2	14	19,2
Gesamt		73	100,0	73	100,0
5-Fluorocytosin					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,031	S	11	15,1		
0,063	S	53	72,6		
0,125	S	9	12,3		
<=1	S			73	100,0
Gesamt		73	100,0	73	100,0
Fluconazol					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=1	S			1	1,4
1	S	1	1,4		
2	S	2	2,7	3	4,1
4	S	16	21,9	15	20,5
8	S	33	45,2	32	43,8
16	I	11	15,1	11	15,1
32	I	1	1,4	3	4,1
64	R	5	6,8		
>=64	R			8	11,0
128	R	3	4,1		
>=256	R	1	1,4		
Gesamt		73	100,0	73	100,0

<i>C. glabrata</i>					
Voriconazol					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,031	S	1	1,4		
0,063	S	1	1,4		
<=0,12	S			56	76,7
0,125	S	3	4,1		
0,25	S	28	38,4	6	8,2
0,5	S	28	38,4		
1	S	2	2,7	6	8,2
2	I	3	4,1	2	2,7
4	R	5	6,8	2	2,7
8	R	2	2,7		
>=8	R			1	1,4
Gesamt		73	100,0	73	100,0

RIS: Kategorielle Bewertung als resistent, intermediär oder sensibel

3.4.3 Empfindlichkeit von *C. krusei* (siehe Tabelle 3.4.3)

Alle 21 getesteten Stämme der Spezies *C. krusei* erwiesen sich mittels Mikrobouillondilutionsmethode getestet als sensibel gegenüber Amphotericin B. Durch das VITEK 2 Verfahren getestet zeigten sich 17 Stämme (81,0%) sensibel und 4 Stämme (19,0%) wurden intermediär bewertet.

Bei den Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber 5-Fluorocytosin erwiesen sich mittels Mikrobouillondilutionsmethode 1 Stamm (4,8%) als sensibel, 18 (85,7%) der Stämme als intermediär und 2 (9,5%) der Stämme als resistent. Getestet durch das VITEK 2 Verfahren erwiesen sich 2 (9,6%) der Stämme als sensibel und 19 (90,4) der Stämme als intermediär.

Bei den Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber Fluconazol erwiesen sich mittels Mikrobouillondilutionsmethode 1 Stamm (4,8%) als sensibel, 17 (80,9%) der Stämme als Dosis-abhängig sensibel und 3 (14,3%) der Stämme als resistent. Getestet durch das VITEK 2 Verfahren erwiesen sich 9 (42,8%) der Stämme als sensibel, 11 (52,4%) als Dosis-abhängig sensibel und 1 Stamm (4,8%) als resistent gegenüber Fluconazol.

Bei den Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber Voriconazol erwiesen sich anhand beider Bestimmungsmethoden alle 21 Stämme (100,0%) als sensibel.

Tabelle 3.4.3: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller *C. krusei* Isolate (n=21)

<i>C. krusei</i>					
Amphotericin B					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,125	S	1	4,8		
<=0,25	S			1	4,8
0,5	S	3	14,3	12	57,1
1	S	17	81	4	19,0
2	I			4	19,0
Gesamt		21	100,0	21	100,0
5-Fluorocytosin					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=1	S			1	4,8
4	S	1	4,8	1	4,8
8	I			8	38,1
16	I	18	85,7	11	52,4
32	R	2	9,5		
Gesamt		21	100,0	21	100,0
Fluconazol					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
2	S			1	4,8
4	S			2	9,5
8	S	1	4,8	6	28,6
16	I	5	23,8	9	42,9
32	I	12	57,1	2	9,5
64	R	3	14,3		
>=64	R			1	4,8
Gesamt		21	100,0	21	100,0
Voriconazol					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,12	S			21	100,0
0,25	S	6	28,6		
0,5	S	14	66,7		
1	S	1	4,8		
Gesamt		21	100,0	21	100,0

RIS: Kategorielle Bewertung als resistent, intermediär oder sensibel

3.4.4 Empfindlichkeit von *C. lusitaniae* (siehe Tabelle 3.4.4)

Alle 29 getesteten Stämme (100,0%) der Spezies *C. lusitaniae* erwiesen sich als sensibel gegenüber Amphotericin B. Dieses Ergebnis zeigte sich bei beiden Resistenzbestimmungsmethoden.

Bei den Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber 5-Fluorocytosin erwiesen sich mittels Mikrobouillondilutionsmethode 27 (93,1%) der Stämme als sensibel und 2 (6,9%) der Stämme als resistent. Getestet durch das VITEK 2 Verfahren erwiesen sich 27 (93,1%) der Stämme als sensibel und 2 (6,9%) der Stämme als intermediär.

Bei den Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber Fluconazol erwiesen sich mittels Mikrobouillondilutionsmethode alle 29 getesteten Stämme (100,0%) als sensibel. Getestet durch das VITEK 2 Verfahren erwiesen sich 28 (96,6%) der Stämme als sensibel, 1 Stamm (3,4%) als resistent gegenüber Fluconazol.

Bei den Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber Voriconazol erwiesen sich anhand beider Resistenzbestimmungsmethoden alle 21 Stämme (100,0%) als sensibel.

Tabelle 3.4.4: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller *C. lusitaniae* Isolate (n=29)

<i>C. lusitaniae</i>					
Amphotericin B					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,125	S	2	6,9		
<=0,25	S			13	44,8
0,25	S	22	75,9		
0,5	S	5	17,2	16	55,2
Gesamt		29	100,0	29	100,0
5-Fluorocytosin					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,031	S	24	82,8		
0,063	S	3	10,3		
<=1	S			27	93,1
16	I			2	6,9
>=128	R	2	6,9		
Gesamt	R	29	100,0	29	100,0

<i>C. lusitaniae</i>					
Fluconazol					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,25	S	4	13,8		
0,5	S	8	27,6		
<=1	S			28	96,6
1	S	11	37,9		
2	S	5	17,2		
8	S	1	3,4		
>=64	R			1	3,4
Gesamt		29	100,0	29	100,0
Voriconazol					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,008	S	7	24,1		
0,016	S	14	48,3		
0,031	S	7	24,1		
<=0,12	S			29	100,0
0,125	S	1	3,4		
Gesamt		29	100,0	29	100,0

RIS: Kategorielle Bewertung als resistent, intermediär oder sensibel

3.4.5 Empfindlichkeit von *C. parapsilosis* (siehe Tabelle 3.4.5)

Alle 88 getesteten Stämme (100,0%) der Spezies *C. parapsilosis* erwiesen sich anhand beider Resistenzbestimmungsmethoden als sensibel gegenüber den 4 Antimykotika Amphotericin B, 5-Fluorocytosin, Fluconazol und Voriconazol.

Tabelle 3.4.5: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller *C. parapsilosis* Isolate (n=88)

<i>C. parapsilosis</i>					
Amphotericin B					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,25	S			42	47,7
0,25	S	1	1,1		
0,5	S	27	30,7	46	52,3
1	S	60	68,2		
Gesamt		88	100,0	88	100,0

<i>C. parapsilosis</i>					
5-Fluorocytosin					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,063	S	5	5,7		
0,125	S	38	43,2		
0,25	S	42	47,7		
<=1	S			88	100,0
2	S	1	1,1		
4	S	2	2,3		
Gesamt		88	100,0	88	100,0
Fluconazol					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,25	S	12	13,6		
0,5	S	39	44,3		
<=1	S			77	87,5
1	S	27	30,7		
2	S	8	9,1	10	11,4
4	S	2	2,3	1	1,1
Gesamt		88	100,0	88	100,0
Voriconazol					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,016	S	19	21,6		
0,031	S	30	34,1		
0,063	S	28	31,8		
<=0,12	S			88	100,0
0,125	S	8	9,1		
0,25	S	3	3,4		
Gesamt		88	100,0	88	100,0

RIS: Kategoriale Bewertung als resistent, intermediär oder sensibel

3.4.6 Empfindlichkeit von *C. tropicalis* (siehe Tabelle 3.4.6)

Alle 51 getesteten Stämme (100,0%) der Spezies *C. tropicalis* erwiesen sich anhand beider Resistenzbestimmungsmethoden als sensibel gegenüber den 4 Antimykotika Amphotericin B, 5-Fluorocytosin, Fluconazol und Voriconazol.

Tabelle 3.4.6: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller *C. tropicalis* Isolate (n=51)

<i>C. tropicalis</i>					
Amphotericin B					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,25	S			30	58,8
0,25	S	9	17,6		
0,5	S	35	68,6	21	41,2
1	S	7	13,7		
Gesamt		51	100,0	51	100,0
5-Fluorocytosin					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<=0,031	S	6	11,8		
0,063	S	28	54,9		
0,125	S	16	31,4		
0,25	S	1	2		
<=1	S			51	100,0
Gesamt		51	100,0	51	100,0
Fluconazol					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,25	S	12	23,5		
0,5	S	34	66,7		
<=1	S			51	100,0
1	S	4	7,8		
4	S	1	2,0		
Gesamt		51	100,0	51	100,0
Voriconazol					
		Mikrobouillondilution		VITEK 2	
MHK (mg/l)	RIS	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0,016	S	2	3,9		
0,031	S	31	60,8		
0,063	S	16	31,4		
<=0,12	S			51	100,0
0,125	S	1	2,0		
0,25	S	1	2,0		
Gesamt		51	100,0	51	100,0

RIS: Kategorielle Bewertung als resistent, intermediär oder sensibel

3.4.7 Resistenztestung der übrigen *Candida* Spezies

Alle 9 getesteten Stämme der Spezies *Debaryomyces* erwiesen sich mit MHK Werten von ≤ 1 ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Amphotericin B, mit MHK Werten von ≤ 8 ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Fluconazol, mit MHK Werten von ≤ 1 ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber 5-Fluorocytosin und mit MHK Werten von $\leq 0,5$ ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Voriconazol. Dieses Ergebnis zeigte sich bei beiden Resistenzbestimmungsmethoden.

Alle 4 getesteten Stämme der Spezies *C. famata* erwiesen sich mit MHK Werten von $\leq 0,5$ ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Amphotericin B, mit MHK Werten von ≤ 8 ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Fluconazol, mit MHK Werten von ≤ 1 ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber 5-Fluorocytosin und mit MHK Werten von $\leq 0,125$ ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Voriconazol. Dieses Ergebnis zeigte sich bei beiden Resistenzbestimmungsmethoden.

Beide getesteten Stämme der Spezies *C. sake* erwiesen sich mit MHK Werten von ≤ 1 ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Amphotericin B, mit MHK Werten von ≤ 1 ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Fluconazol, mit MHK Werten von ≤ 1 ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber 5-Fluorocytosin und mit MHK Werten von $\leq 0,12$ ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Voriconazol. Dieses Ergebnis zeigte sich bei beiden Resistenzbestimmungsmethoden.

Beide getesteten Stämme der Spezies *Cryptococcus neoformans* erwiesen sich mit MHK Werten von $\leq 0,5$ ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Amphotericin B, mit MHK Werten von ≤ 4 ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Fluconazol, mit MHK Werten von ≤ 4 ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber 5-Fluorocytosin. Dieses Ergebnis zeigte sich bei beiden Resistenzbestimmungsmethoden. Getestet mittels Mikrobouillondilution zeigten sich die Stämme mit MHK-Werten von $\leq 0,25$ ($\mu\text{g/ml}$) als sensibel gegenüber Voriconazol. Getestet gegenüber Voriconazol mittels VITEK 2 ergab sich trotz mehrmaliger Versuche kein Ergebnis.

Die getesteten Stämme der Spezies *C. dubliniensis*, *C. rugosa* und *Malassezia furfur* erwiesen sich mit entsprechenden MHK-Werten als sensibel gegenüber allen 4 Antimykotika. Dieses Ergebnis zeigte sich bei beiden Resistenzbestimmungsmethoden. Auch für *C. norvegensis* ergaben sich übereinstimmende Ergebnisse. Für den Stamm *Trichosporon asahii* ergaben sich ebenfalls übereinstimmende Ergebnisse, abgesehen von der Testung gegenüber 5-

Fluorocytosin, welche mittels Referenzmethode als intermediär und mittels VITEK 2 als sensibel gewertet wurde.

Der eine *C. guilliermondii* Stamm erwies sich mittels beider Methoden getestet als sensibel gegenüber Amphotericin B und 5-Fluorocytosin, sowie intermediär gegenüber Voriconazol. Mittels Referenzmethode getestet galt er mit dem MHK-Wert von 32 ($\mu\text{g/ml}$) als Dosis-abhängig sensibel, mittels VITEK 2 getestet mit dem MHK-Wert von ≥ 64 ($\mu\text{g/ml}$) als resistent gegenüber Fluconazol.

3.5 Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der Resistenzbestimmung mittels Mikrobouillondilution im standardisierten Verfahren und dem semiautomatisierten Verfahren für verschiedene Antimykotika

Um beide Resistenzbestimmungsmethoden miteinander vergleichen zu können, wurden die ermittelten MHK-Werte für jeden Stamm und jedes Antimykotikum gegenübergestellt. Falls es Abweichungen der MHK-Werte, die durch die unterschiedlichen Methoden ermittelt wurden, gab, wurde dieses in MHK-Stufen ausgedrückt. Zeigte sich bei dem Vergleich von den MHK-Werten eine Abweichung von zwei Stufen, wurde dieses als kleiner Fehler gewertet. Bei der Abweichung von drei oder mehr Stufen wurde dieses als großer Fehler gewertet.

Insgesamt gab es 14 Stämme, bei denen Fehler bei mehr als einem Antimykotikum gefunden wurden: hierzu gehörten 6 *C. glabrata* Isolate, 5 *C. krusei* Isolate, 2 *C. parapsilosis* Isolate und 1 *C. albicans* Isolat.

Insgesamt betrachtet ergaben sich für die 4 Antimykotika Amphotericin B, 5-Fluorocytosin, Fluconazol und Voriconazol 103 kleine und 24 große Fehler. Bei den großen Fehlern handelte es sich hauptsächlich um die Spezies *C. albicans* (bei 15 der insgesamt 24 großen Fehler) und die Antimykotika Fluconazol (13 der 24 großen Fehler) und 5-Fluorocytosin (7 der 24 großen Fehler) (siehe Tabelle 3.5.1).

Im Hinblick auf die 24 großen Fehler wurden die Isolate in 10 Fällen durch das VITEK 2 System als sensibler und in 14 Fällen durch die Mikrobouillondilutionsmethode als sensibler getestet. Somit erwies sich die Richtung der großen Fehler als nicht durchgehend konstant. Allerdings zeigte sich bei all denjenigen großen Fehlern, die bei den Testungen von *C. albicans* gegenüber Fluconazol auftraten, dass die Isolate in diesem Fall immer durch die Mikrobouillondilutionsmethode als sensibler getestet wurden. Diese Konstellation

erscheint weniger gefährlich, da sich hierbei nicht die Gefahr ergibt, Patienten mit dem falschen, jedoch durch das VITEK 2 Gerät als empfindlich getesteten Antimykotikum zu behandeln. Bei der Konstellation *C. albicans* gegenüber 5-Fluorocytosin gingen die Fehler in beide Richtungen, das heißt, in einigen Fällen wurden die Isolate durch das VITEK 2 System als sensibler getestet, wodurch sich die Gefahr ergibt, Patienten mit einem durch das VITEK 2 Gerät fälschlich als empfindlich getesteten Antimykotikum zu behandeln.

Zusätzlich erfolgte eine weitere Form der Fehlerdefinition, welche auch vermehrt in der gängigen Literatur angewandt wird. Diese orientiert sich an der Übereinstimmung der Kategorien sensibel, intermediär und resistent. Die Zuordnung der MHK-Werte zu diesen Kategorien erfolgte anhand standardisierter Grenzwerte, welche vom CLSI vorgegeben sind.

Falls *Candida* Isolate durch das VITEK 2 System als sensibel und gleichzeitig durch die CLSI Referenzmethode als resistent getestet wurden, gilt das als sehr großer Fehler (very major error). Der umgekehrte Fall wurde als großer Fehler (major error) bezeichnet. Alle übrigen Konstellationen, bei denen eine der beiden Methoden das Ergebnis sensibel oder resistent herausgab, während die andere Methode das Ergebnis intermediär oder Dosis-abhängig sensibel anzeigte, wurden als kleine Fehler (minor error) gewertet.

Es fanden sich 6 sehr große Fehler: In 6 Fällen wurden die VITEK 2 Ergebnisse fälschlicherweise als sensibel interpretiert, während die Referenzmethode dieselben Stämme als resistent erschienen ließ. Dieser Zustand ist im Hinblick auf die klinische Praxis insofern am gefährlichsten, als dass die Gefahr besteht, Patienten mit dem falschen, jedoch durch das VITEK 2 Gerät als sensibel getesteten Antimykotikum zu behandeln. Hierbei handelte es sich 3mal um die Spezies *C. glabrata* gegenüber Voriconazol, 2mal um die Spezies *C. albicans* gegenüber 5-Fluorocytosin und 1mal um die Spezies *C. krusei* gegenüber Fluconazol. Desweiteren fanden sich 3 große Fehler, welche bei den Testungen gegenüber 5-Fluorocytosin und Fluconazol auftraten. Insgesamt wurden 49 kleine Fehler ermittelt, die hauptsächlich, das heißt in 32 Fällen, bei den Testungen gegenüber Fluconazol gefunden wurden (siehe Tabelle 3.5.2).

Tabelle 3.5.1: Große und kleine Fehler insgesamt (basierend auf der Anzahl der abweichenden MHK-Stufen)

Gesamt							
	Anzahl Stämme	große Fehler		kleine Fehler		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Amphotericin B	510	0	0,0	29	5,7	29	5,7
5-Fluorocytosin	510	7	1,4	11	2,2	18	3,5
Fluconazol	510	13	2,5	21	4,1	34	6,7
Voriconazol	510	4	0,8	42	8,3	46	9,0
Gesamt	2040	24	1,2	103	5,0	127	6,2

Tabelle 3.5.2: Sehr große, große und kleine Fehler insgesamt (very major, major, minor errors)

Gesamt									
	Anzahl Stämme	sehr große Fehler		große Fehler		kleine Fehler		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Amphotericin B	510	0	0,0	0	0,0	4	0,8	4	0,8
5-Fluorocytosin	510	2	0,4	2	0,4	8	1,6	12	2,4
Fluconazol	510	1	0,2	1	0,2	32	6,3	34	6,7
Voriconazol	510	3	0,6	0	0,0	5	1,0	8	1,6
Gesamt	2040	6	0,3	3	0,1	49	2,4	58	2,8

3.5.1 Amphotericin B

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine essentielle Übereinstimmung von 100% für Amphotericin B. Die essentielle Übereinstimmung drückt den prozentualen Anteil von Isolaten aus, der, mittels beider Methoden getestet, innerhalb von zwei MHK-Wert Abstufungen liegt. Die MHK-Werte der Isolate dürfen dabei nicht mehr als zwei Abstufungen voneinander abweichen.

In der gängigen Literatur wird aus mehreren Gründen auf die Bestimmung der kategoriellen Übereinstimmung für Amphotericin B verzichtet. Die kategorielle Übereinstimmung beschreibt den prozentualen Anteil aller Isolate, welcher mittels beider Methoden getestet denselben festgesetzten Kategorien (sensibel, intermediär, resistent) angehört. Aus eben diesen Gründen, welche in der Diskussion näher erläutert werden, wurde sich auch in der hier vorliegenden Arbeit auf die Bestimmung der essentiellen Übereinstimmung beschränkt.

Insgesamt fanden sich keine großen, jedoch 29 kleine Fehler für Amphotericin B. Der Hauptanteil, das heißt 21 der kleinen Fehler, trat bei der Spezies *C. parapsilosis* (23,9%) auf. 5 kleine Fehler zeigten sich bei der Spezies *C. tropicalis* (9,8%), jeweils einen Fehler gab es bei den Spezies *C. glabrata* (1,4%), *C. krusei* (4,8%) und bei den seltener vertretenen *Candida* Spezies (4,3%), in diesem Fall bei einem *Debaryomyces* Isolat (siehe Tabelle 3.5.1.1).

Im Hinblick auf die zweite Möglichkeit der Fehlerdefinition gab es weder sehr große noch große Fehler. Insgesamt fanden sich 4 kleine Fehler, die alle bei der Spezies *C. krusei* (19,0%) auftraten (siehe Tabelle 3.5.1.2).

Tabelle 3.5.1.1: Große und kleine Fehler bei Amphotericin B (basierend auf der Anzahl der abweichenden MHK-Stufen)

Amphotericin B							
Spezies	Anzahl	große Fehler		kleine Fehler		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>C. albicans</i>	225	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. glabrata</i>	73	0	0,0	1	1,4	1	1,4
<i>C. parapsilosis</i>	88	0	0,0	21	23,9	21	23,9
<i>C. lusitaniae</i>	29	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. krusei</i>	21	0	0,0	1	4,8	1	4,8
<i>C. tropicalis</i>	51	0	0,0	5	9,8	5	9,8
<i>Candida spp.</i>	23	0	0,0	1	4,3	1	4,3
Gesamt	510	0	0,0	29	5,7	29	5,7

Tabelle 3.5.1.2: Sehr große, große und kleine Fehler bei Amphotericin B (very major, major, minor errors)

Amphotericin B									
Spezies	Anzahl	sehr große Fehler		große Fehler		kleine Fehler		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>C. albicans</i>	225	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. glabrata</i>	73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. parapsilosis</i>	88	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. lusitaniae</i>	29	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. krusei</i>	21	0	0,0	0	0,0	4	19,0	4	19,0
<i>C. tropicalis</i>	51	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>Candida spp.</i>	23	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Gesamt	510	0	0,0	0	0,0	4	0,8	4	0,8

3.5.2 5-Fluorocytosin

Die essentielle Übereinstimmung für 5-Fluorocytosin betrug 98,6% (503/510). Die kategorielle Übereinstimmung für 5-Fluorocytosin betrug 97,6% (498/510).

Insgesamt fanden sich 7 große und 11 kleine Fehler für 5-Fluorocytosin. Der Hauptanteil, das heißt 5 der großen Fehler, trat bei der Spezies *C. albicans* (2,2%) auf. Zwei große Fehler traten bei der Spezies *C. lusitaniae* (6,9%) auf. Die kleinen Fehler fanden sich 5mal bei *C. albicans* (2,2%), 2mal bei *C. parapsilosis* (2,3%), 3mal bei *C. krusei* (14,3%) und 1mal (4,3%) bei den seltener vertretenen *Candida* Spezies, in diesem Fall bei einem *Trichosporon asahii* Isolat (siehe Tabelle 3.5.2.1).

Im Hinblick auf die zweite Möglichkeit der Fehlerdefinition gab es sowohl 2 sehr große, als auch 2 große Fehler bei der Spezies *C. albicans* (0,9%). Insgesamt fanden sich 8 kleine Fehler. Diese traten 2mal bei der Spezies *C. albicans* (0,9%), 2mal bei der Spezies *C. lusitaniae* (6,9%), 3mal bei der Spezies *C. krusei* (14,3%) und 1mal bei den seltener vertretenen *Candida* Spezies (4,3%) auf. Bei letzterem handelte es sich wieder um das *Trichosporon asahii* Isolat (siehe Tabelle 3.5.2.2).

Tabelle 3.5.2.1: Große und kleine Fehler bei 5-Fluorocytosin (basierend auf der Anzahl der abweichenden MHK-Stufen)

5-Fluorocytosin							
Spezies	Anzahl	große Fehler		kleine Fehler		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>C. albicans</i>	225	5	2,2	5	2,2	10	4,4
<i>C. glabrata</i>	73	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. parapsilosis</i>	88	0	0,0	2	2,3	2	2,3
<i>C. lusitaniae</i>	29	2	6,9	0	0,0	2	6,9
<i>C. krusei</i>	21	0	0,0	3	14,3	3	14,3
<i>C. tropicalis</i>	51	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>Candida</i> spp.	23	0	0,0	1	4,3	1	4,3
Gesamt	510	7	1,4	11	2,2	18	3,5

Tabelle 3.5.2.2: Sehr große, große und kleine Fehler bei 5-Fluorocytosin (very major, major, minor errors)

5-Fluorocytosin									
Spezies	Anzahl	sehr große Fehler		große Fehler		kleine Fehler		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>C. albicans</i>	225	2	0,9	2	0,9	2	0,9	6	2,7
<i>C. glabrata</i>	73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. parapsilosis</i>	88	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. lusitaniae</i>	29	0	0,0	0	0,0	2	6,9	2	6,9
<i>C. krusei</i>	21	0	0,0	0	0,0	3	14,3	3	14,3
<i>C. tropicalis</i>	51	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>Candida spp.</i>	23	0	0,0	0	0,0	1	4,3	1	4,3
Gesamt	510	2	0,4	2	0,4	8	1,6	12	2,4

3.5.3 Fluconazol

Die essentielle Übereinstimmung für Fluconazol betrug 97,4% (497/510). Die kategorielle Übereinstimmung für Fluconazol betrug 93,3% (476/510).

Insgesamt fanden sich 13 große und 21 kleine Fehler für Fluconazol. Der Hauptanteil, das heißt 10 der großen Fehler, trat bei der Spezies *C. albicans* (4,4%) auf. Zwei große Fehler traten bei der Spezies *C. krusei* (9,5%), 1 großer Fehler trat bei der Spezies *C. lusitaniae* (3,4%) auf. Die kleinen Fehler fanden sich bei 9mal bei *C. glabrata* (12,3%), 5mal bei *C. krusei* (23,8%), 4mal bei *C. parapsilosis* (4,5%), 2mal bei *C. albicans* (0,9%) und 1mal bei *C. tropicalis* (2,0%) (siehe Tabelle 3.5.3.1).

Im Hinblick auf die zweite Möglichkeit der Fehlerdefinition gab es einen sehr großen Fehler bei der Spezies *C. krusei* (4,8%) und einen großen Fehler bei der Spezies *C. lusitaniae* (3,4%). Insgesamt fanden sich 32 kleine Fehler. Diese fanden sich hauptsächlich, das heißt in 22 Fällen, bei der Spezies *C. glabrata* (30,1%). Weitere kleine Fehler fanden sich 8mal bei der Spezies *C. krusei* (38,1%), 1mal bei der Spezies *C. albicans* (0,4%) und 1mal bei den seltener vertretenen *Candida* Spezies (4,3%). Bei letzterem handelte es sich um ein *C. guilliermondii* Isolat (siehe Tabelle 3.5.3.2).

Tabelle 3.5.3.1: Große und kleine Fehler bei Fluconazol (basierend auf der Anzahl der abweichenden MHK-Stufen)

Fluconazol							
Spezies	Anzahl	große Fehler		kleine Fehler		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>C. albicans</i>	225	10	4,4	2	0,9	12	5,3
<i>C. glabrata</i>	73	0	0,0	9	12,3	9	12,3
<i>C. parapsilosis</i>	88	0	0,0	4	4,5	4	4,5
<i>C. lusitaniae</i>	29	1	3,4	0	0,0	1	3,4
<i>C. krusei</i>	21	2	9,5	5	23,8	7	33,3
<i>C. tropicalis</i>	51	0	0,0	1	2,0	1	2,0
<i>Candida spp.</i>	23	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Gesamt	510	13	2,5	21	4,1	34	6,7

Tabelle 3.5.3.2: Sehr große, große und kleine Fehler bei Fluconazol (very major, major, minor errors)

Fluconazol									
Spezies	Anzahl	sehr große Fehler		große Fehler		kleine Fehler		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>C. albicans</i>	225	0	0,0	0	0,0	1	0,4	1	0,4
<i>C. glabrata</i>	73	0	0,0	0	0,0	22	30,1	22	30,1
<i>C. parapsilosis</i>	88	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. lusitaniae</i>	29	0	0,0	1	3,4	0	0,0	1	3,4
<i>C. krusei</i>	21	1	4,8	0	0,0	8	38,1	9	42,9
<i>C. tropicalis</i>	51	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>Candida spp.</i>	23	0	0,0	0	0,0	1	4,3	1	4,3
Gesamt	510	1	0,2	1	0,2	32	6,3	34	6,7

3.5.4 Voriconazol

Die essentielle Übereinstimmung für Voriconazol betrug 99,2% (506/510). Die kategorielle Übereinstimmung für Voriconazol betrug 98,4% (502/510).

Insgesamt fanden sich 4 große und 42 kleine Fehler für Voriconazol. Der Hauptanteil, das heißt 27 der kleinen Fehler, trat bei der Spezies *C. glabrata* auf (37,0%). Zwei große Fehler zeigten sich bei der Spezies *C. glabrata* (2,7%), je 1 großer Fehler trat bei der Spezies *C. albicans* (0,4%) und *C. krusei* (4,8%) auf. Die übrigen kleinen

Fehler fanden sich 14mal bei *C. krusei* (66,7%) und 1mal bei den seltener vertretenen Spezies (4,3%). Bei letzterem handelte es sich um ein *Debaryomyces* Isolat (siehe Tabelle 3.5.4.1).

Im Hinblick auf die zweite Möglichkeit der Fehlerdefinition gab es drei sehr große Fehler bei der Spezies *C. glabrata* (4,1%). Insgesamt fanden sich 5 kleine Fehler, ebenfalls bei der Spezies *C. glabrata* (6,8%) (siehe Tabelle 3.5.4.2).

Tabelle 3.5.4.1: Große und kleine Fehler bei Voriconazol (basierend auf der Anzahl der abweichenden MHK-Stufen)

Voriconazol							
Spezies	Anzahl	große Fehler		kleine Fehler		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>C. albicans</i>	225	1	0,4	0	0,0	1	0,4
<i>C. glabrata</i>	73	2	2,7	27	37,0	29	39,7
<i>C. parapsilosis</i>	88	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. lusitaniae</i>	29	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. krusei</i>	21	1	4,8	14	66,7	15	71,4
<i>C. tropicalis</i>	51	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>Candida spp.</i>	23	0	0,0	1	4,3	1	4,3
Gesamt	510	4	0,8	42	8,2	46	9,0

Tabelle 3.5.4.2: Sehr große, große und kleine Fehler bei Voriconazol (very major, major, minor errors)

Voriconazol									
Spezies	Anzahl	sehr große Fehler		große Fehler		kleine Fehler		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>C. albicans</i>	225	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. glabrata</i>	73	3	4,1	0	0,0	5	6,8	8	11,0
<i>C. parapsilosis</i>	88	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. lusitaniae</i>	29	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. krusei</i>	21	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. tropicalis</i>	51	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>Candida spp.</i>	23	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Gesamt	510	3	0,6	0	0,0	5	1,0	8	1,6

4. Diskussion

1356 *Candida* Isolate, die im Rahmen des SCOPE Projektes in dem Zeitraum von 1997 bis 2006 aus unterschiedlichen Regionen der USA zusammengetragen wurden, wurden im IMMIH weitergehend identifiziert. Es handelte sich ausschließlich um Blutkulturisolate, deren zugehörige *Candida* Spezies durch Chromagar (mittels Farbindikatorprinzip), durch das VITEK 2 Identifizierungssystem und in seltenen Fällen durch die Assimilationsmethode ermittelt wurden. Bei allen drei Methoden handelt es sich um etablierte Verfahren, die häufig zur Identifizierung von Hefepilzen eingesetzt werden [3, 27].

Der im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Anteil von *C. albicans* Isolaten betrug 48,0%. Der Anteil von *C. albicans*, der innerhalb multizentrischer Studien in den USA in dem Zeitraum von 1995 bis 2000 ermittelt wurde, betrug 45% bis 53% [60], was im Einklang mit dem von uns ermittelten Anteil steht. Eine weitere Arbeit, die innerhalb der USA durchgeführt wurde, berichtet von einem *C. albicans* Anteil von 45% bei *Candida* Blutstrominfektionen, was ebenfalls mit unseren Ergebnissen übereinstimmt [33]. Im Rahmen der SENTRY Studie wurden 1.184 *Candida* Blutstromisolate weitergehend untersucht. Diese wurden in 71 medizinische Zentren, die sich in den USA, Kanada, Lateinamerika und Europa befanden, in dem Zeitraum von 1997 bis 1999 gesammelt. Hierbei machte die Spezies *C. albicans* einen Anteil von 55% in den USA, 60% in Kanada, 45% in Lateinamerika und 58% in Europa aus. Die Gründe für die globalen Häufigkeitsschwankungen von *C. albicans* bleiben laut den Autoren spekulativ [66]. In einer Studie, die am Universitätsklinikum Köln von Seifert et al. durchgeführt wurde, wurden 296 *Candida* Blutstromisolate weitergehend untersucht. Hierbei machte *C. albicans* einen Anteil von 56,1% aus [83]. Obwohl *C. albicans* weltweit betrachtet die dominierende Spezies bei Blutstrominfektionen darstellt, variiert die Erscheinungsfrequenz stark. Die Autoren Pfaller et al., die epidemiologische Aspekte der invasiven Candidiasis thematisieren, beschreiben unter anderem diese Häufigkeitsschwankungen. Pfaller et al. berichten von einem besonders niedrigen *C. albicans* Anteil von 37% in Lateinamerika (in den Jahren 1995 bis 1996) und einem besonders hohen Anteil von 70% in Norwegen (in den Jahren 1991 bis 2003) [60].

Für die Spezies *C. parapsilosis* ergab sich in der hier vorliegenden Arbeit ein Anteil von 18,7%. In anderen, multizentrischen Studien innerhalb den USA variierte der prozentuale Anteil dieser Spezies, ermittelt in dem Zeitraum von 1992 bis 2004, zwischen 13% und 21% [60], was im Einklang mit unseren Ergebnissen steht. In einer weiteren Studie von Hajjeh et al., welche zwischen 1998 und 2000 in den USA durchgeführt wurde, machte *C. parapsilosis* einen Anteil von 13% aus [33]. Laut der SENTRY Studie gilt *C. parapsilosis* in Europa, Lateinamerika und Kanada, ermittelt in dem Zeitraum von 1997 bis 1999, mit Anteilen von 19%, 25% bzw. 16% als häufigster non-*C. albicans* Erreger von Blutstrominfektionen [66]. In der Studie, die am Universitätsklinikum Köln durchgeführt wurde, machte *C. parapsilosis* einen Anteil von nur 7,8% aus [83].

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie machte die Spezies *C. glabrata* einen Anteil von 16,4% aus. *C. glabrata* gilt mit einem etwas höheren Anteil von 20% bis 24% hinter *C. albicans* als zweithäufigster Verursacher von Candida Blutstrominfektionen in den Vereinigten Staaten [60]. Hajjeh et al. gaben in ihrer Studie einen *C. glabrata* Anteil von 24% in den USA an [33]. Diese Spezies ist in den meisten anderen Ländern weit weniger häufig. Bemerkenswert ist zum Beispiel ein sehr geringes Vorkommen von *C. glabrata* in Lateinamerika mit nur 4% bis 7%. Die Gründe für diese starken Häufigkeitsschwankungen von *C. glabrata* als Verursacher von Blutstrominfektionen sind nicht eindeutig klar, allerdings wird unter anderem die Exposition gegenüber Azolen, das Alter der Patienten und die vorliegende Grunderkrankung diskutiert [60]. Diese Faktoren könnten auch die Abweichung in der hier vorliegenden Arbeit erklären. Laut der SENTRY Studie machte *C. glabrata* in dem Zeitraum von 1997-2000 einen prozentualen Anteil von 21% in den USA, 12% in Kanada, 6% in Lateinamerika und 10% in Europa aus [66]. In der Kölner Studie wurde ein Anteil von 15,5% bei dieser Spezies ermittelt [83].

Die Spezies *C. tropicalis* und *C. krusei* fanden sich in unserer Studie in einer Häufigkeit von 11,2% bzw. 1,5% der Isolate. Dies steht im Einklang mit anderen, in den USA ermittelten Daten, in denen eine Häufigkeit von 7% bis 12% bzw. 2% bis 4% angegeben wird [60]. Laut der SENTRY Studie stellte *C. tropicalis* einen prozentualen Anteil von 9% in den USA, 6% in Kanada, 16% in Lateinamerika und 7% in Europa dar, während *C. krusei* mit einem Anteil von 2% in den USA, 2% in Kanada, 1% in Lateinamerika und 1% in Europa nachgewiesen wurde [66]. Der in

Köln ermittelte prozentuale Anteil von *C. tropicalis* betrug 8,4%, während die Spezies *C. krusei* mit einem Anteil von 3,7% nachgewiesen wurde [83].

Der von uns ermittelte Anteil der Spezies *C. lusitaniae* erschien mit 2,1% nur geringfügig höher als in multizentrischen Studien in den Vereinigten Staaten, in denen ein durchschnittlicher Anteil von 1% angegeben wird [33, 60].

510 *Candida*-Stämme wurden sowohl mittels Mikrobouillondilution (Referenzmethode) als auch mittels dem zu evaluierenden VITEK 2 System resistenzgetestet. Die Mikrobouillondilutionsmethode, deren Vorgehensweise das NCCLS M27-A2 Dokument beschreibt [15], gilt als akzeptierter Standard zur Resistenztestung von *Candida* Spezies und wird deshalb auch in vielen anderen Studien zur Resistenzbestimmung eingesetzt [17, 25, 26, 45, 48]. Die nachfolgende Diskussion des Resistenzverhaltens gegenüber den vier fokussierten Antimykotika bezieht sich somit auf die Ergebnisse, die durch diese Referenzmethode, also durch Mikrobouillondilution, ermittelt wurden.

Alle 510 mittels Mikrobouillondilution getesteten Isolate unterschiedlicher *Candida* Spezies erwiesen sich in unserer Studie als sensibel gegenüber Amphotericin B, was für die gute Wirksamkeit und das breite Wirkspektrum dieses Antimykotikums spricht. In einer weiteren Studie, die in den USA von Park et al. durchgeführt wurde, war ebenfalls kein getestetes *Candida* Isolat resistent gegenüber Amphotericin B [56]. Auch in einer Studie von Cuenca-Estrella et al. erwies sich dieses Antimykotikum in vitro als aktiv gegenüber allen 351 in diesem Rahmen getesteten *Candida* Isolaten [19]. In der Kölner Studie von Seifert et al. zeigte sich dasselbe Ergebnis, alle 296 getesteten *Candida* Isolate waren sensibel gegenüber Amphotericin B [83].

Allerdings gilt die Detektion von Resistenzen mittels CLSI M27-A2 Mikrobouillondilution gegenüber Amphotericin B als problematisch: Obwohl sich diese Methode als reproduzierbar erwiesen hat, kann durch sie nur ein eingegrenzter Bereich von MHK-Werten für dieses Antimykotikum ermittelt werden. Aus diesem Grund ist eine verlässliche Diskriminierung zwischen sensiblen und resistenten *Candida* Isolaten sowie auch die Festlegung von interpretativen MHK-Grenzwerten nicht möglich [56, 78]. Obwohl aus diesem Grund interpretative Grenzwerte in der Literatur nicht fest etabliert sind, gelten *Candida* Isolate mit MHK-Werten von $>1\mu\text{g/ml}$ als möglicherweise resistent oder aber auch als Dosis-abhängig sensibel. Bei Dosis-abhängig sensibel getesteten Isolaten sollte dem Patienten eine höhere

Dosis des Antimykotikums verabreicht werden, um einen Therapieerfolg zu erreichen [56, 60, 77]. Im Allgemeinen zeigten sich Agar-basierte Methoden wie der E-Test am verlässlichsten und sensitivsten bei der Aufdeckung von Resistenzen von *Candida* Spezies gegenüber Amphotericin B. Von einigen Autoren wird der E-Test im Vergleich mit der NCCLS Referenzmethode diesbezüglich sogar als überlegen dargestellt. Desweiteren gewährleistet der E-Test einen breiteren Bereich von ermittelbaren MHK-Werten [14, 56, 93].

Die Resistenzmechanismen gegenüber Amphotericin B sind bisher nicht eindeutig geklärt. Allerdings wird ein verminderter Ergosterol-Gehalt der Pilzmembran, ohne dabei die Lebensfähigkeit der Zelle zu beeinflussen, mit resistenten Isolaten assoziiert [57]. Desweiteren existiert die Annahme, dass Resistenzen durch eine verstärkte Katalase-Aktivität vermittelt werden, wodurch eine verminderte Empfindlichkeit der Pilzzelle gegenüber oxidativer Schädigung erreicht wird [85]. Trotz des breiten Wirkspektrums von Amphotericin B wird heute laut Studienlage eher die Gabe von moderneren Antimykotika empfohlen, da diese weniger toxisch sind [60].

Bei den im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Resistenztestungen gegenüber Fluconazol zeigten sich 467 (91,5%) der Isolate als sensibel, 31 (6,1%) als Dosis-abhängig sensibel und 12 (2,4%) als resistent. Bei den resistenten Stämmen handelte es sich 9mal um die Spezies *C. glabrata* (12,3% der insgesamt 73 getesteten *C. glabrata* Isolate) und 3mal um die Spezies *C. krusei* (14% der insgesamt 21 getesteten *C. krusei* Isolate). Alle *C. albicans* Stämme waren Fluconazol-empfindlich.

Bei den Resistenztestungen gegenüber Voriconazol zeigten sich 499 (97,8%) der Isolate als sensibel, 4 (0,8%) als Dosis-abhängig sensibel und 7 (1,4%) als resistent. Bei den 7 resistenten Isolaten handelte es sich um *C. glabrata* Stämme (9,6% der insgesamt 73 getesteten *C. glabrata* Isolate).

Im Allgemeinen ist der prozentuale Anteil Azol-resistenter Stämme, die bei invasiver Candidiasis isoliert werden, gering. In einer internationalen Studie von Pfaller et al., welche eine sehr große Anzahl (13.338) von *Candida* Blutstromisolaten einschloss, zeigten sich für die einzelnen Spezies resistente Anteile gegenüber Fluconazol von $\leq 3\%$. Der Anteil Fluconazol-resistenter *C. albicans* Isolate betrug dabei 0,06% (8 Isolate). Abweichend waren die beiden Spezies *C. glabrata* und *C. krusei*, bei denen

ein resistenter Anteil von bis zu 9% und 40% beobachtet werden konnte [61]. Viele andere Studien belegen diese Ergebnisse mit ähnlichen, in vitro ermittelten Daten [13, 18, 19, 20, 33, 80, 87].

Die frühere Studie des Universitätsklinikums Köln untersuchte weitergehend das Antimykotikum Isavuconazol, welches die aktive Komponente des neueren Azol-Antimykotikums BAL8557 darstellt. Hierfür wurde die in vitro Wirksamkeit von Isavuconazol mit der in vitro Wirksamkeit von fünf weiteren Antimykotika bei 296 *Candida* Blutstromisolaten verglichen. Bei diesen fünf weiteren Antimykotika handelte es sich um Amphotericin B, Flucytosin, Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol. Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass Isavuconazol sehr effektiv gegen *Candida* Blutstromisolate, eingeschlossen auch Fluconazol-resistente Isolate, wirkt. Bei den Testungen, die innerhalb dieser Studie durchgeführt wurden, erwiesen sich insgesamt 2% der Isolate (*C. glabrata* und *C. krusei*) als resistent gegenüber Fluconazol. 27% (3/11) der getesteten *C. krusei* Isolate und 4% (2/46) der getesteten *C. glabrata* Isolate waren hierbei resistent. Fluconazol-resistente *C. albicans* Stämme konnten nicht nachgewiesen werden. Gegenüber Voriconazol zeigten sich 2% der Isolate als resistent, hierbei handelte es sich um *C. glabrata* Isolate [83].

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Resistenzen gegenüber Fluconazol und Voriconazol sind mit denjenigen der Literatur vereinbar. Eine Ausnahme stellt der mittels Mikrobouillondilution (und auch mittels des VITEK 2 Verfahrens) getestete Anteil Fluconazol-resistenter *C. krusei* Isolate dar, der bei uns mit 14 % deutlich niedriger erschien. Diese Tatsache könnte allerdings damit begründet werden, dass in der hier vorliegenden Arbeit eine kleinere Anzahl von *C. krusei* Isolaten für die Resistenztestung zur Verfügung stand - außerdem waren 17 (81%) der von uns getesteten *C. krusei* Isolate Dosis-abhängig sensibel, was eine verminderte Empfindlichkeit deutlich macht.

Von den 9 *C. glabrata* Isolaten, welche sich als resistent gegenüber Fluconazol erwiesen, waren 7 ebenfalls resistent und 2 Dosis-abhängig sensibel gegenüber Voriconazol. Die vorliegenden Ergebnisse scheinen in Übereinstimmung mit der Literatur dafür zu sprechen, dass viele *Candida*-Stämme, die eine Resistenz gegenüber Fluconazol entwickelt haben, gleichzeitig auch signifikant weniger sensibel gegenüber Voriconazol sind [51, 68]. Bei der Spezies *C. glabrata* sind Kreuzresistenzen zwischen Fluconazol und Voriconazol (und auch den anderen Triazolderivaten) bekannt und werden assoziiert mit einer verstärkten Expression der

Gene *CgCDR1* und *CgCDR2*, welche die CDR Efflux-Pumpen codieren [10, 61, 65, 67, 81]. In *Candida* Spezies werden unterschiedliche Resistenzmechanismen gegenüber Azolen beschrieben. Ein Mechanismus besteht, wie soeben erwähnt, in der Aktivierung von Efflux-Systemen (oder auch in der Verminderung der Antimykotika-Penetration), so dass eine zu geringe Menge des Azols in die Zelle gelangt. Weitere Möglichkeiten sind die Modifikation von Zielstrukturen, eine Überexpression des Targetenzym Cytochrom P 450 sowie die Entwicklung von Umgehungsmechanismen, welche auf Mutationen des *ERG 3* Gens beruhen [42, 57].

Die drei übrigen Fluconazol-resistenten Isolate der hier vorliegenden Arbeit, bei denen es sich um *C. krusei* Stämme handelte, blieben sensibel gegenüber Voriconazol. Auch dieser Befund ist mit der gängigen Literatur vereinbar: Spezies, die wie *C. krusei* für primäre Resistenzen gegenüber Fluconazol bekannt sind, scheinen empfindlich gegenüber Voriconazol zu bleiben [61, 65, 68]. Im Gegensatz zu der Spezies *C. glabrata* sind bei *C. krusei* Kreuzresistenzen zwischen Fluconazol und Voriconazol unüblich [67], weil Voriconazol bei *C. krusei* viel effektiver als Fluconazol an Cytochrom P 450 bindet [28, 86].

Zusammenfassend auch im Hinblick auf die Klinik gilt, dass Voriconazol über ein breiteres Wirkspektrum gegenüber *Candida* Spezies als Fluconazol verfügt [60], wie auch unsere Ergebnisse deutlich machen.

Von den Isolaten, die gegenüber 5-Fluorocytosin getestet wurden, waren 477 (93,5%) sensibel, 21 (4,1%) intermediär und 12 (2,4%) resistent. Bei den resistenten Stämmen handelte es sich 8mal um *C. albicans* (3,6% der insgesamt 225 getesteten *C. albicans* Isolate), 2mal um *C. lusitaniae* (6,9% der insgesamt 29 getesteten *C. lusitaniae* Isolate), und 2mal um *C. krusei* (9,5% der insgesamt 21 getesteten *C. krusei* Isolate).

Die Prävalenz primärer Resistenzen von *Candida* Spezies gegenüber 5-Fluorocytosin ist laut Studienlage mit Anteilen von <2% gering, allerdings wird aufgrund des vermehrten Vorkommens sekundärer Resistenzen in der Klinik generell die Kombination mit Amphotericin B oder Fluconazol empfohlen [40].

In einer groß angelegten, internationalen Studie von Pfaller et al., die 8.803 *Candida* Isolate beinhaltete, wurden ebenfalls in vitro Resistenzen von *Candida* Isolaten gegenüber 5-Fluorocytosin mittels Mikrobouillondilution bestimmt. Die von den

Autoren veröffentlichte Resistenzepidemiologie ist vergleichbar mit unseren Ergebnissen für die meisten Spezies, so auch für *C. albicans* und *C. lusitaniae*. Eine Ausnahme stellt die Spezies *C. tropicalis* dar, für die bei Pfaller et al. eine geringfügig verminderte Sensibilität ermittelt wurde: 92% der *C. tropicalis* Isolate wurden als sensibel beschrieben, während sich bei uns 100% (alle 51 Stämme) sensibel zeigten. In der früheren Kölner Studie betrug der Anteil Flucytosin-sensibler *C. tropicalis* Isolate nur 64% (16/25), die restlichen Isolate dieser Spezies wurden als resistent eingestuft [82]. Eine weitere Ausnahme stellte die Spezies *C. krusei* dar, für die bei Pfaller et al. ein resistenter Anteil von 28% beobachtet wurde, während dieser bei uns nur 9,5% betrug [72]. In der früheren Kölner Studie wurden alle 11 getesteten *C. krusei* Isolate als intermediär eingestuft [82]. Diese Verzerrungen können vermutlich mit der Tatsache begründet werden, dass in der hier vorliegenden Arbeit und auch in der früheren Kölner Studie eine kleinere Anzahl von *C. krusei* und *C. tropicalis* Isolaten für die Resistenztestung zur Verfügung stand.

Insgesamt erwiesen sich in der früheren Kölner Studie 92% der 296 getesteten *Candida* Isolate als sensibel, 4% als intermediär und 4% als resistent gegenüber 5-Fluorocytosin. Zu den resistenten Isolaten gehörten die Spezies *C. albicans*, *C. glabrata* und *C. tropicalis*. Zusammenfassend „nicht sensibel“, also entweder intermediär oder resistent, waren dabei 0,6% der *C. albicans* Isolate, 2,2% der *C. glabrata* Isolate, 100% der *C. krusei* Isolate und 36% der *C. tropicalis* Isolate.

Sekundäre Resistenzen gegenüber 5-Fluorocytosin resultieren aus einer Reihe von Mutationen in verschiedenen Enzymen, welche für die Aufnahme des Antimykotikums oder für intrazelluläre Metabolismen verantwortlich sind. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung des Genes *FCY2* in *C. lusitaniae* zu einer Kreuzresistenz zwischen 5-Fluorocytosin und Fluconazol führt [12]. Diesbezügliche Kreuzresistenzen konnten in der hier vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden, allerdings gab es auch nur zwei 5-Fluorocytosin-resistente und keine Fluconazol-resistenten *C. lusitaniae* Isolate.

In der vorliegenden Studie wurde das VITEK 2 System zur Resistenztestung von *Candida* Spezies angewandt. Die dadurch ermittelten MHK-Werte wurden, zur Evaluierung dieses neueren Verfahrens, den MHK-Werten der CLSI Referenzmethode (Mikrobouillondilution im standardisierten Verfahren) gegenübergestellt.

Um die Übereinstimmung der durch die beiden Methoden ermittelten MHK-Werte zu veranschaulichen, wurden die vom CLSI vorgegebenen Grenzwerte verwendet, um eine interpretative Zuordnung aller Werte zu den Kategorien resistent, sensibel und intermediär (beziehungsweise Dosis-abhängig sensibel) vornehmen zu können. Dadurch konnten kategorielle Übereinstimmungen in Form von Prozentzahlen ausgedrückt werden. Hierfür wurde für jedes Antimykotikum (außer für Amphotericin B, wie nachfolgend erläutert) der prozentuale Anteil aller Isolate berechnet, der mittels beider Methoden getestet denselben Kategorien angehörte.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine sehr gute Korrelation zwischen den beiden Methoden aufgezeigt werden: Die kategorielle Übereinstimmung der beiden Resistenzbestimmungsmethoden lag für 5-Fluorocytosin bei 97,6%, das heißt in 498 von 510 Fällen stimmten die Kategorien (resistent, sensibel, intermediär bzw. Dosis-abhängig sensibel) überein. Bei Voriconazol gab es eine kategorielle Übereinstimmung von 98,4% (in 502 von 510 Fällen) und bei Fluconazol von 93,3% (in 476 von 510 Fällen). Die Ergebnisse stehen im Einklang mit denjenigen, die in zwei multizentrischen Studien von Pfaller et al. ermittelt wurden [62, 63]. In diesen Studien zeigte sich eine kategorielle Übereinstimmung von 98,1% und 98,6% für die Antimykotika 5-Fluorocytosin und Voriconazol, sowie von 97,2% für Fluconazol. Weitere Untersuchungen von Zambardi et al. sowie Posteraro et al. [73] zeigten mit Werten von über 90% ebenfalls eine gute Korrelation.

Aufgrund der Tatsache, dass in mehreren Studien eine schlechte Korrelation von in vitro und in vivo Wirksamkeit von Amphotericin B aufgezeigt wurde [49, 56] und auch seitens des CLSI keine interpretativen Grenzwerte für dieses Antimykotikum vorgegeben sind, um Isolate eindeutigen Kategorien (resistent, intermediär, sensibel) zuordnen zu können, verzichteten Pfaller et al. in diesem Fall auf die Bestimmung der kategoriellen Übereinstimmung. Für dieses Antimykotikum wurde sich ausschließlich auf die essentielle Übereinstimmung berufen. Die essentielle Übereinstimmung drückt den prozentualen Anteil von Isolat aus, der, mittels beider Methoden getestet, innerhalb von zwei MHK-Wert Abstufungen liegt. Bei Pfaller et al. machte das einen Anteil von 97% aus. In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine essentielle Übereinstimmung von 100% (510/510) für Amphotericin B. Diese Tatsache belegt auch für dieses Antimykotikum eine zufriedenstellende Korrelation der beiden Resistenzbestimmungsmethoden.

Die essentielle Übereinstimmung für 5-Fluorocytosin betrug 98,6% (503/510), für Voriconazol 99,2% (506/510) und für Fluconazol 97,4 (497/510). Auch diese Ergebnisse stimmen mit der gängigen Literatur überein und belegen eine gute Korrelation der beiden Resistenzbestimmungsmethoden.

Um die MHK-Werte weitergehend im Detail vergleichen zu können, wurde in der hier vorliegenden Studie eine Definition von sogenannten Fehlern vorgenommen. Diese erfolgte im Hinblick auf die Übereinstimmung von MHK-Stufen. Falls sich bei dem Vergleich der MHK-Werte eine Abweichung von zwei Stufen zeigte, wurde das als kleiner Fehler (minor error) gewertet. Bei der Abweichung von drei oder mehr Stufen, wurde das als großer Fehler (major error) gewertet.

Bei den Studien von Pfaller et al. und Posteraro et al. [62, 63, 73] wurde eine andere Definition von Fehlern verwendet: Falls *Candida* Isolate durch das VITEK 2 System als sensibel und gleichzeitig durch die CLSI Referenzmethode als resistent getestet wurden, galt das als sehr großer Fehler (very major error). Der umgekehrte Fall wurde als großer Fehler (major error) bezeichnet. Alle übrigen Ergebnis-Diskrepanzen, also falls eine der beiden Methoden das Ergebnis sensibel oder resistent herausgab, während die andere Methode das Ergebnis intermediär oder Dosis-abhängig sensibel anzeigte, wurden als kleine Fehler (minor error) gewertet.

Nach der soeben beschriebenen Fehlereinteilung kann folglich eine Differenz der MHK-Werte von zwei oder sogar mehr Stufen nach der Definition von Pfaller et al. oder Posteraro et al. gegebenenfalls immer noch als kein (oder kleiner) Fehler definiert werden (je nach dem, in welchem Bereich der CLSI Grenzwerte diese Stufen liegen), während ein solcher Zustand nach unserer Definition schon als kleiner (oder großer) Fehler gelten würde. Aus diesem Grund ist die von uns vorgenommene Definition präziser und macht schon auf geringere Diskrepanzen aufmerksam.

Insgesamt fanden sich in der hier vorliegenden Arbeit nach der von uns festgelegten Fehlerdefinition 103 kleine und 24 große Fehler. Die großen Fehler traten hauptsächlich bei der Spezies *C. albicans* (bei 15 der insgesamt 24 großen Fehler) und bei den Antimykotika Fluconazol (13 der 24 großen Fehler) sowie bei 5-Fluorocytosin (7 der 24 großen Fehler) auf.

Im Hinblick auf die 24 großen Fehler wurden die Isolate in 10 Fällen durch das VITEK 2 System als sensibler und in 14 Fällen durch die Mikrobouillon-dilutionsmethode als sensibler getestet. Somit erwies sich die Richtung der großen

Fehler als nicht durchgehend konstant. Allerdings zeigte sich bei all denjenigen großen Fehlern, die bei den Testungen von *C. albicans* gegenüber Fluconazol auftraten, dass die Isolate in diesem Fall immer durch die Mikrobouillondilutionsmethode als sensibler getestet wurden. Diese Konstellation erscheint weniger gefährlich, da sich hierbei nicht die Gefahr ergibt, Patienten möglicherweise mit dem falschen, jedoch durch das VITEK 2 Gerät als empfindlich getesteten Antimykotikum zu behandeln. Bei der Konstellation *C. albicans* gegenüber 5-Fluorocytosin gingen die Fehler in beide Richtungen - dass heißt in einigen Fällen wurden die Isolate durch das VITEK 2 System als sensibler getestet, wodurch sich die Gefahr ergibt, Patienten möglicherweise mit dem falschen, jedoch durch das VITEK 2 Gerät als empfindlich getesteten Antimykotikum zu behandeln.

Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass das VITEK 2 System im Vergleich mit der CLSI Referenzmethode zwar insgesamt betrachtet ein verlässliches Verfahren darstellt, um Resistenzen von aus Blutstrominfektionen gewonnenen *Candida* Isolaten zu bestimmen, allerdings sollten die Ergebnisse für *C. albicans* vor allem bei dem Antimykotikum 5-Fluorocytosin mit Vorsicht interpretiert werden, da sich hier potentielle Fehler finden könnten, welche mit therapeutischen und somit auch prognostischen Konsequenzen behaftet sein könnten.

Um die von uns erhobenen Daten besser mit der gängigen Literatur vergleichen zu können, wurde zusätzlich die Fehlereinteilung der anderen Autoren in die drei Kategorien sehr große Fehler, große Fehler und kleine Fehler vorgenommen. Hierbei fanden sich 6 sehr große Fehler: 6 Isolate wurden fälschlicherweise durch das VITEK 2 System als sensibel interpretiert, während die Referenzmethode dieselben Stämme als resistent erschienen ließ. Dieser Zustand ist in Bezug auf die klinische Praxis insofern am gefährlichsten, als dass die Gefahr besteht, Patienten mit dem falschen, jedoch durch das VITEK 2 Gerät als empfindlich getesteten Antimykotikum zu behandeln. In unserem Fall handelte es sich hierbei 3mal (4,1%) um die Spezies *C. glabrata* gegenüber Voriconazol, 2mal (0,9%) um die Spezies *C. albicans* gegenüber 5-Fluorocytosin und 1mal (4,8%) um die Spezies *C. krusei* gegenüber Fluconazol. Auch bei Pfaller et al. fanden sich sehr große Fehler: 3mal (1,5%) bei *C. albicans* Stämmen gegenüber 5-Fluorocytosin und 1mal (1,2%) bei *C. glabrata* gegenüber Voriconazol. Demnach sollten (neben der soeben erwähnten Vorsicht bei *C. albicans* gegenüber 5-Fluorocytosin) Ergebnisse für *C. glabrata* gegenüber Voriconazol mit Vorsicht interpretiert werden, da sich auch hier potentielle Fehler

finden könnten. Bei Posteraro et al. wurden dagegen keine sehr großen Fehler beobachtet [73].

Auffällig und daher erwähnenswert ist das Vorkommen einer größeren Anzahl von kleinen Fehlern bei der Spezies *C. glabrata* gegenüber Fluconazol. In dieser Kombination fanden sich bei uns 22 kleine Fehler (30,1%): In 9 Fällen wurden die Isolate durch das VITEK 2 System als sensibel getestet, während sich durch die Mikrobouillondilutionsmethode das Ergebnis Dosis-abhängig sensibel ergab. In 10 Fällen war es genau anders herum (also in 10 Fällen wurden die Isolate durch das VITEK 2 System als Dosis-abhängig sensibel getestet, während sich durch die Mikrobouillondilutionsmethode das Ergebnis sensibel ergab). Ein Isolat wurde durch das VITEK 2 System als resistent getestet, während sich durch die Mikrobouillondilutionsmethode das Ergebnis Dosis-abhängig sensibel ergab. In 2 Fällen war es genau anders herum. Somit gingen die Abweichungen der 22 kleinen Fehler in beide Richtungen. Bei Pfaller et al. zeigte sich dieselbe Tendenz. Die Autoren erklärten dieses Phänomen allerdings damit, dass die meisten MHK-Werte für Fluconazol, mittels beider Methoden getestet, nahe um den Grenzwert verteilt liegen, der die Kategorien sensibel von Dosis-abhängig sensibel abgrenzt. Demnach erscheint es als nicht verwunderlich, dass sich, nach ihrer Fehlerdefinition, schneller und vermehrt kleine Fehler ergeben. Aussagekräftiger ist wohl in diesem Zusammenhang, dass die bei uns mittels Mikrobouillondilution als Fluconazol-resistent getesteten *C. glabrata* Isolate auch durch das VITEK 2 System als resistent (außer 2mal als Dosis-abhängig sensibel) bewertet wurden. Diese Tatsache spricht für die Verlässlichkeit des VITEK 2 Systems in Bezug auf die Aufdeckung von Resistenzen (oder zumindest einer verminderten Empfindlichkeit) bei *C. glabrata* gegenüber Fluconazol. Diese Schlussfolgerung wurde auch durch die Ergebnisse der anderen Studien bestätigt.

Nur einer der von uns untersuchten *Candida*-Stämme wuchs innerhalb des VITEK 2 Systems trotz mehrmaliger Versuche nicht richtig an und konnte deswegen nicht durch dieses System getestet werden. Es handelte sich hierbei um einen *C. glabrata* Stamm, der mittels Mikrobouillondilutionsmethode getestet gegenüber Fluconazol Dosis-abhängig sensibel erschien. Auch in der Studie von Posteraro et al. gab es zwei Isolate, die sich im VITEK 2 System nicht untersuchen ließen. Bei diesen handelte es sich um Azol-resistente *C. glabrata* Stämme. Für diese zwei beschriebenen *C. glabrata* Isolate wurde eine „petite“-Mutation nachgewiesen und in

diesem Zusammenhang erläutert, dass Isolate mit „petite“-Mutation einer starken Wachstumsretardierung in bestimmten Medien unterliegen. Die Wachstumsretardierung soll auf einem Atmungsdefekt der Hefezelle beruhen [11]. Diese Möglichkeit könnte auch für unser Isolat in Betracht gezogen werden.

Die vom VITEK 2 System ermittelten MHK-Werte standen nach 15h oder weniger zur Verfügung, was auch im Einklang mit den Angaben der anderen Autoren steht. Somit ist dieses Verfahren schneller als die Referenzmethode. Es ermöglicht eine Standardisierung und Automatisierung vieler für die Empfindlichkeitsprüfung wichtiger Schritte und eliminiert dadurch Fehler, die im Zusammenhang mit manueller oder visueller Methodik entstehen können. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zeigt die Verlässlichkeit des VITEK 2 Systems an, außerdem wird durch den Einsatz dieses Systems Arbeitszeit und damit auch Personalaufwand verringert. Durch den automatisierten Gebrauch der Spektrophotometrie wird der „trailing effect“ minimiert [63] und auch Azol-Resistenzen von *Candida* Spezies werden zuverlässig aufgedeckt [73]. Allerdings sollte auch erwähnt werden, dass eine weniger genaue MHK-Wert-Ermittlung durch dieses weitgehend automatisierte System im Vergleich zu der CLSI Referenzmethode erfolgt und dass in manchen Fällen, wie weiter oben genauer erläutert, eine geringe Gefahr der Ermittlung falscher Ergebnisse besteht. Im Allgemeinen stellt die Resistenztestung mittels des VITEK 2 Systems eine Möglichkeit zur Optimierung für die Therapie invasiver *Candida* Infektionen dar. In der Zukunft sollte das System allerdings auch die Empfindlichkeitsprüfung gegenüber moderneren Antimykotika wie Posaconazol, Caspofungin oder Anidulafungin ermöglichen, um den klinischen Nutzen auszuweiten.

5. Zusammenfassung

Generalisierte Mykosen bedingt durch Hefepilze der Gattung *Candida* werden zunehmend häufig beobachtet und gehen mit einer hohen Letalität einher. Der wichtigste Grund für die deutliche Zunahme invasiver Candidiasis ist die wachsende Anzahl von immunkomprimierten Patienten. Bedeutsam für das Auftreten opportunistischer Pilzinfektionen ist in diesem Zusammenhang die zunehmende Nutzung zytotoxischer Chemotherapien und Breitbandantibiotika, sowie die nach Transplantationen notwendige Gabe von Immunsuppressiva. Weltweit betrachtet sind *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. krusei* in über 90% die krankheitsverursachenden Spezies. Aufgrund des vermehrten Vorkommens invasiver Pilzinfektionen werden sowohl klassische als auch neuere Antimykotika zunehmend häufiger eingesetzt. Diese Tatsache verdeutlicht nicht nur die Wichtigkeit der Kenntnis über die Resistenzlage von *Candida* Spezies, sondern auch die Notwendigkeit der standardisierten und reproduzierbaren antimykotischen Empfindlichkeitsprüfung. Die Ziele der hier vorliegenden Arbeit bestanden in der Erhebung neuer Daten zur Speziesverteilung und Resistenzepidemiologie von *Candida* Blutstromisolaten sowie in der Evaluierung eines semiautomatisierten Verfahrens (VITEK 2) zur Resistenztestung. Im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität zu Köln erfolgte zunächst die Speziesidentifizierung von 1356 *Candida* Blutstromisolaten. Diese wurden im Rahmen des SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance) Projektes im Zeitraum von 1997 bis 2006 aus unterschiedlichen geographischen Regionen der USA prospektiv gesammelt. Die meisten Stämme ließen sich mittels Chromagar durch ein Farbindikatorprinzip auf Speziesebene identifizieren. Für die hierdurch nicht eindeutig identifizierbaren Stämme wurden das semiautomatisierte Identifizierungssystem (VITEK 2) und die Assimilationsmethode (API ID 32 C) eingesetzt. Die Spezies *C. albicans* machte einen Anteil von 48% aus, während *C. parapsilosis* in 19%, *C. glabrata* in 16%, *C. tropicalis* in 11% und *C. krusei* in 2% der Fälle identifiziert werden konnten. Der prozentuale Anteil unterschiedlicher Spezies unterliegt sowohl zeitlichen als auch geographischen Schwankungen, dennoch verbleibt *C. albicans* bei Blutstrominfektionen weltweit betrachtet die dominierende Spezies. Die vorliegenden Ergebnisse stehen

weitgehend im Einklang mit denjenigen von anderen multizentrischen Studien aus den USA. Eine Abweichung stellte der prozentuale Anteil von *C. glabrata* dar, welcher in unserem Kollektiv etwas geringer als sonst üblich erschien. Allerdings sind für diese Spezies starke Häufigkeitsschwankungen bekannt, die unter anderem mit der Exposition gegenüber Azolen, dem Alter der Patienten und der vorliegenden Grunderkrankung begründet werden. Für die Erhebung der Resistenzepidemiologie wurden 510 *Candida* Isolate ausgewählt und gegenüber den vier Antimykotika Amphotericin B, Fluconazol, Voriconazol sowie 5-Fluorocytosin getestet. Bei der Auswahl dieser 510 Stämme wurden jeder dritte Stamm der Spezies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* sowie alle Stämme der übrigen, seltener vorkommenden Spezies miteinbezogen. Für die Empfindlichkeitsprüfung von *Candida* Isolaten gibt es verschiedene kommerziell erhältliche Testmethoden, bei denen es sich um Agar- oder Bouillon-basierte Methoden handelt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Mikrobouillondilutionsmethode, die vom damaligen NCCLS (National Committee for Clinical and Laboratory Standards) entwickelt wurde, verwendet. Dieses Verfahren gilt als akzeptierter Standard und diente somit auch als Referenzmethode für die Evaluierung der Resistenztestung, die mittels des alternativen, semiautomatisierten VITEK 2 Systems durchgeführt wurde. Bei der Empfindlichkeitsprüfung mittels Mikrobouillondilution wurde visuell die minimale Hemmkonzentration (MHK) für jedes Antimykotikum bestimmt. Die MHK beschreibt die niedrigste Konzentration eines Antimykotikums, bei der das Pilzwachstum in vitro noch gehemmt wird. Die MHK-Werte wurden anschließend den Kategorien sensibel, intermediär und resistent zugeordnet. Für diese Zuordnung der MHK-Werte erfolgte eine Orientierung an standardisierten Grenzwerten. Bei der Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Amphotericin B erwiesen sich 100% der Isolate als sensibel, was für das breite Wirkspektrum dieses Antimykotikums spricht. Allerdings gilt laut gängiger Literatur die Aufdeckung von Resistenzen gegenüber Amphotericin B mittels der Mikrobouillondilution als problematisch, da es für dieses Antimykotikum keine klare Definition von interpretativen MHK-Grenzwerten gibt. Diese Tatsache wird mit dem sehr engen Bereich der MHK-Werte begründet, die der Erfahrung nach für Amphotericin B ermittelt werden können. Als geeignetere Verfahren gelten in diesem Fall Agar-basierte Methoden wie der E-Test. Bei der Empfindlichkeitsprüfung gegenüber den zwei fokussierten Triazolderivaten erwiesen sich 2% der Isolate als resistent gegenüber Fluconazol und 1% als resistent gegenüber Voriconazol. Bei den

resistenten Stämmen handelte es sich ausschließlich um die beiden Spezies *C. glabrata* und *C. krusei*. Die im Rahmen der vorliegenden Studie ermittelten Resistenzen gegenüber den Triazolderivaten sind mit denjenigen der Literatur vereinbar. Eine Ausnahme stellte der Anteil Fluconazol-resistenter *C. krusei* Isolate dar, der in der hier vorliegenden Arbeit niedriger erschien. Allerdings stand für die vorgenommene Resistenztestung nur eine geringe Anzahl von Isolaten dieser Spezies zur Verfügung, womit diese Abweichung erklärt werden könnte. Zudem erwies sich der Hauptanteil der *C. krusei* Isolate als Dosis-abhängig sensibel, was zumindest auf eine verminderte Empfindlichkeit hindeutete. Als Resistenzmechanismen gegenüber Azolen werden die Modifikation von Zielstrukturen, einer Überexpression des Targetenzym Cytochrom P 450 sowie die Aktivierung von Efflux-Systemen diskutiert. Als weiterer Mechanismus gilt die Entwicklung von Umgehungsmechanismen, welche auf Mutationen des *ERG 3* Gens beruhen. Die meisten *C. glabrata* Isolate, welche sich als resistent gegenüber Fluconazol erwiesen, waren ebenfalls resistent gegenüber Voriconazol. Bei dieser Spezies sind Kreuzresistenzen zwischen diesen beiden Antimykotika bekannt und werden mit einer verstärkten Expression von Genen assoziiert, welche für bestimmte Efflux-Pumpen der Pilzzelle kodieren. Bei der Empfindlichkeitsprüfung gegenüber 5-Fluorocytosin erwiesen sich 2% der Isolate als resistent, hierbei handelte es sich um die Spezies *C. albicans*, *C. krusei* und *C. lusitanae*. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen größtenteils mit denjenigen der Literatur überein, bis auf den prozentualen Anteil resistenter *C. krusei* Isolate, der in Köln getestet geringer erschien. Vermutlich kann diese Abweichung auch an dieser Stelle damit begründet werden, dass für die vorgenommene Resistenztestung nur eine geringe Anzahl von Isolaten dieser Spezies zur Verfügung stand. Resistenzen gegenüber 5-Fluorocytosin resultieren aus unterschiedlichen Mutationen in verschiedenen Enzymen, welche für die Aufnahme des Antimykotikums in die Zelle oder für intrazelluläre Metabolismen verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte zudem die Evaluierung der Resistenztestung mittels des moderneren VITEK 2 Systems, welches die spektrophotometrische Bestimmung des Pilzwachstums und somit eine weitgehend automatisierte und objektive Empfindlichkeitstestung von *Candida* Spezies ermöglicht. Hierfür wurden kategorielle sowie essentielle Übereinstimmungen mit der Referenzmethode ermittelt. Die kategorielle Übereinstimmung beschreibt den prozentualen Anteil aller

Isolate, welcher mittels beider Methoden getestet denselben Kategorien (sensibel, intermediär, resistent) angehört. Die essentielle Übereinstimmung drückt den prozentualen Anteil von Isolate aus, der, mittels beider Methoden getestet, innerhalb von zwei MHK-Wert Abstufungen liegt. Für die drei Antimykotika Fluconazol, Voriconazol und 5-Fluorocytosin ergaben sich zufriedenstellende Korrelationen von über 90%. Aufgrund der Tatsache, dass seitens des CLSI keine interpretativen Grenzwerte für Amphotericin B vorgegeben sind, um den Isolaten die soeben erwähnten Kategorien zuordnen zu können, wurde für dieses Antimykotikum nur die essentielle Übereinstimmung bestimmt. Auch hierbei ergab sich eine zufriedenstellende Korrelation von über 90%. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denjenigen vergleichbarer Studien. Um die MHK-Werte weitergehend im Detail vergleichen zu können, wurde eine Fehlerdefinition vorgenommen, wobei große von kleinen Fehlern unterschieden wurden. Eine Abweichung von zwei MHK-Stufen wurde als kleiner Fehler und eine Abweichung von drei oder mehr MHK-Stufen als großer Fehler gewertet. Hierbei zeigten sich 24 große Fehler, vor allem bei der Spezies *C. albicans* und den beiden Antimykotika Fluconazol und 5-Fluorocytosin.

Im Hinblick auf die 24 großen Fehler wurden die Isolate in 10 Fällen durch das VITEK 2 System als sensibler und in 14 Fällen durch die Mikrobouillon-dilutionsmethode als sensibler getestet. Somit erwies sich die Richtung der großen Fehler als nicht durchgehend konstant. Allerdings zeigte sich bei all denjenigen großen Fehlern, die bei den Testungen von *C. albicans* gegenüber Fluconazol auftraten, dass die Isolate in diesem Fall immer durch die Mikrobouillondilutionsmethode als sensibler getestet wurden. Diese Konstellation erscheint weniger gefährlich, da sich hierbei nicht die Gefahr ergibt, Patienten mit dem falschen, jedoch durch das VITEK 2 Gerät als empfindlich getesteten Antimykotikum zu behandeln. Bei der Konstellation *C. albicans* gegenüber 5-Fluorocytosin gingen die Fehler in beide Richtungen - das heißt in einigen Fällen wurden die Isolate durch das VITEK 2 System als zu sensibel getestet, wodurch sich die Gefahr ergibt, Patienten mit dem falschen, durch das VITEK 2 Gerät fälschlich als empfindlich getesteten Antimykotikum zu behandeln.

Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass das VITEK 2 System im Vergleich mit der CLSI Referenzmethode zwar insgesamt betrachtet ein verlässliches Verfahren darstellt, um Resistenzen von aus Blutstrominfektionen gewonnenen *Candida* Isolaten zu bestimmen, allerdings sollten die Ergebnisse für *C. albicans* vor allem bei

dem Antimykotikum 5-Fluorocytosin mit Vorsicht interpretiert werden, da sich hier potentielle Fehler finden könnten, welche mit therapeutischen und somit auch prognostischen Konsequenzen behaftet sein könnten.

Eine weitere Form der Fehlerdefinition, welche auch in der gängigen Literatur angewandt wird, orientiert sich an der Übereinstimmung der Kategorien sensibel, intermediär und resistent. Um die vorliegenden Daten besser mit der Literatur vergleichen zu können, wurde auch diese Fehlereinteilung angewandt. Demnach sollten (neben der soeben erwähnten Vorsicht bei *C. albicans* gegenüber 5-Fluorocytosin) auch Ergebnisse für *C. glabrata* gegenüber Voriconazol mit Vorsicht interpretiert werden. Die aus dieser weiteren Form der Fehlerdefinition resultierenden Ergebnisse stehen im Einklang mit denjenigen vergleichbarer Studien. Zusammenfassend zeigte sich das VITEK 2 System auch hinsichtlich dieser Fehlereinteilung als ein zuverlässiges Verfahren zur Resistenzbestimmung von *Candida* Blutstromisolaten. Durch die Standardisierung vieler für die Empfindlichkeitsprüfung wichtiger Schritte können subjektive Fehler eliminiert werden, zudem ist das Verfahren weit weniger arbeitsintensiv. Die Testergebnisse stehen schneller zur Verfügung, jedoch wird eine weniger genaue MHK-Wert Angabe gewährleistet. Aufgrund der nicht vollkommenen Übereinstimmung mit der Referenzmethode besteht die geringe Gefahr potentieller Fehler, welche, wie weiter oben erläutert, therapeutische Konsequenzen haben können. Bisher ist die Empfindlichkeitsprüfung mittels des VITEK 2 Systems nur gegenüber den vier in dieser Arbeit untersuchten Antimykotika erhältlich. Im Hinblick auf den klinischen Nutzen sollte das System zukünftig ebenfalls die Resistenztestung gegenüber moderneren Antimykotika ermöglichen. Insgesamt betrachtet ermöglicht das VITEK 2 System eine rasche und zuverlässige Resistenztestung von *Candida* Isolaten, welche die Therapie invasiver *Candida* Infektionen verbessern könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, Alonso-Tarres C, Rodriguez-Tudela JL, Pahissa A, and the Barcelona Candidemia Project Study Group (2006). Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 44: 1681-5
2. Arndt CA, Walsh TJ, McCully CL, Balis FM, Pizzo PA, Popleck DG (1988). Fluconazol penetration into cerebrospinal fluid: implications for treating fungal infections of the central nervous system. *J Infect Dis.* 157:178-80
3. Aubertine CL, Rivera M, Rohan SM, Larone DH (2006). Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar Candida as a source medium with the new card. *J Clin Microbiol.* 44: 227-8
4. Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Vittoria AD, Arzeni D, Manso E, Scalise G (2006). Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 2719-27
5. Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, Seger DL, Gomes DRJ, Dasbach EJ, Platt R (2001). Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin Infect Dis.* 32: 686-93
6. Bennett JE (2006). Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. *N Engl J Med.* 355: 1154-9
7. Biomérieux (2007). VITEK 2 Benutzerhandbuch 510731-9DE1
8. Biomérieux (2007). VITEK 2 Systems Produktinformationen 510809 - 1DE1
9. Biomérieux (2007). VITEK 2-Software und Advanced Expert System - Benutzerhandbuch 510771-3DE1
10. Borst A, Raimer MT, Warnock DW, Morrison CJ, Arthington-Skaggs BA (2005). Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 783-7
11. Brun S, Dalle F, Saulnier P, Renier G, Bonnin A, Chabasse D, Bouchara JP (2005). Biological consequences of petite mutations in *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother.* 56: 307-14

12. Chapeland-Leclerc F, Bouchoux J, Goumar A, Chastin C, Villard J, Noe T (2005). Inactivation of the *FCY2* gene encoding purine-cytosine permease promotes cross-resistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 3101-8
13. Chen YC, Chang SC, Luh KT, Hsieh WC (2003). Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. *J Antimicrob Chemother.* 52: 71-7
14. Clancy CJ, Nguyen MH (1999). Correlation between in vitro susceptibility determined by E-test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 1289-1290
15. Clinical and Laboratory Standards Institute / formerly the National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard, 2nd ed., M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA
16. Coenye T, De Vos M, Vandenbosch D, Nelis H (2007). Factors influencing the trailing endpoint observed in *Candida albicans* susceptibility testing using the CLSI procedure. *Clin Microbiol Infect.* 14: 495-7
17. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL (2005). Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 486-92
18. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL (2006). Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 917-21
19. Cuenca-Estrella M, Rodriguez D, Almirante B, Morgan J, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Salvado M, Warnock DW, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL (2005). In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* 55: 194-9
20. Cuenca-Estrella M, Rodero L, Garcia-Effron G, Rodriguez-Tudela JL. (2002). Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. *J Antimicrob Chemother.* 49: 981-7
21. Davey KG, Szekely A, Johnson EM, Warnock DW (1998). Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standard method in-vitro susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrob Chemother.* 42: 439-44

22. Deray G. (2002). Amphotericin B nephrotoxicity. *J Antimicrob Chemother.* 49: 37-41
23. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP (1999). Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis.* 29: 239-44
24. Edwards JE (2005). *Candida* Species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R Principles and Practice of Infectious Disease. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, p. 2938-57
25. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE (2005). International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 43: 3884-9
26. Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Messer SA, Knapp CC, Holliday N, Killian SB (2004). Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 42: 718-21
27. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P (2001). Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Medical mycology.* 39: 9-33
28. Fukuoka T, Johnston DA, Winslow CA, de Groot MJ, Burt C, Hitchcock CA, Filler SG (2003). Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 1213-9
29. Galgiani JN, Reiser J, Brass C, Espinel-Ingroff A, Gordon MA, Kerkering TM (1987). Comparison of relative susceptibilities of *Candida* species to three antifungal agents as determined by understanding methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 31: 1343-7
30. Grillot R, Lebeau B (2005). Systemic antifungal agents. In: Bryskier A. *Antimicrobial Agents.* 1st ed. Washington DC: ASM Press, p. 1260-87
31. Haase G (2009). Antimykotika. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* 6. Ausgabe. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, S. 751-60
32. Haase G (2009). Hefen. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* 6. Ausgabe. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, S. 607-14

45. Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH (2003). Correlation between E-test disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 1647-51
46. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, Warnock DW (2001). Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis.* 33: 641-7
47. Merz WG. (1984). *C. lusitaniae*: frequency of recovery, colonisation, infection, and amphotericin B resistance. *J Clin Microbiol.* 20: 1194-5
48. Morace G, Amato G, Bistoni F, Fadda G, Marone P, Montagna MT, Oliveri S, Polonelli L, Rigoli R, Mancuso I, La Face S, Masucci L, Romano L, Napoli C, Tato D, Buscema MG, Belli CMC, Piccirillo MM, Conti S, Covan S, Fanti F, Cavanna C, Alo FD, Pitzurra L (2002). Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the NCCLS M27-A Broth Microdilution Method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 40: 2953-8
49. Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman DR, Sutton DA, Rinaldi MG (1998). Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis.* 177: 425-30
50. Nucci M, Marr KA (2005). Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis.* 41: 521-6
51. Panackal AA, Gribskov JL, Staab JF, Kirby KA, Rinaldi M, Marr KA (2006). Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 44:1740-3
52. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009. 48: 503-35
53. Pappas PG, Rotstein CMF, Betts RF, Nucci M, Talwar D, De Waele JJ, Vazquez JA, Dupont BF, Horn DL, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Suh B, Digumarti R, Wu Chunzhang, Kovanda LL, Arnold LJ, Buell DN (2007). Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis.* 45: 883-93
54. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE (2004). Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis.* 38: 161-89

55. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE (2003). A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis.* 37: 634-43
56. Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, Iqbal N, Ciblak MA, Lee-Yang W, Hairston MD, Phelan M, Plikaytis BD, Sofair AN, Harrison LH, Fridkin SK, Warnock DW (2006). Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 1287-92
57. Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingroff A (2009). Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 7: 453-60
58. Pfaller MA (2005). Antifungal susceptibility testing methods. *Curr Drug Targets.* 6: 929-43
59. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ (2006). In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. *J Clin Microbiol.* 44: 760-3
60. Pfaller MA, Diekema DJ (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 20: 133-63
61. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ (2006). Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 19: 435-47
62. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG (2007). Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 45: 3522-8
63. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG (2007). Multicenter comparison of the VITEK 2 yeast susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 45: 796-802
64. Pfaller MA, Diekema DJ (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 42: 4419-31

65. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, Tiraboschi N, Nagy E, Gibbs DL and the Global Antifungal Surveillance Group (2005). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol.* 43: 5848-59
66. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA and the SENTRY Participant Group (2001). International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol.* 39: 3254-9
67. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Troke P, Walsh TJ, Warnock DW (2006). Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol.* 44: 819-26
68. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, Fu W, Colombo AL, Rodriguez-Noriega E and the Global Antifungal Surveillance Group (2007). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997-2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol.* 45: 1735-45
69. Pfaller MA, Hazen KC, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ (2004). Comparison of results of fluconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Program. *J Clin Microbiol.* 42: 3607-12
70. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP (1998). National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 30: 121-9
71. Pfaller MA, Jones RN for the Microbiology Resource Committee of the College of the American Pathologists (2006). Performance accuracy of antibacterial and antifungal susceptibility test methods: report from the College of American Pathologists (CAP) Microbiology Survey Program (2001-2003). *Arch Pathol Lab Med.* 130: 767-78

72. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Huynh H, Hollis RJ, Diekema DJ (2002). In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 3518-21
73. Posteraro B, Martucci R, La Sorda M, Fiori B, Sanglard D, De Carolis E, Florio AR, Fadda G, Sanguinetti M. (2009). Reliability of the Vitek 2 Yeast Susceptibility Test for detection of in vitro resistance to fluconazole and voriconazole in clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 47: 1927-30
74. Rambali B, Fernandez JA, Van Nuffel L, Woestenborghs F, Baert L, Massart DL, Odds FC (2001). Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: a process analysis of test variables. *J Antimicrob Chemother.* 48: 163-77
75. Reboli AC, Rotstein C, PG Pappas, Chapman SW, Kett DH, Kumar D, Betts R, Wible M, Goldstein BP, Schranz J, Krause DS, Walsh TJ for the Anidulafungin Study Group (2007). Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 356: 2472-82
76. Rex JH, Bennett JE, Sugar AM, Pappas PG, van der Horst CM, Edwards JE, Washburn RG, Scheld WM, Karchmer AW, Dine AP, Levenstein MJ, Webb CD for the Candidemia Study Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (1994). A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. *N Engl J Med.* 331: 1325-30
77. Rex JH, Pfaller MA (2002). Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis.* 35: 982-9
78. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. (2001). Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev.* 14: 643-58
79. Rex JH, Pappas PG, Karchmer AW, Sobel J, Edwards JE, Hadley S, Brass C, Vazquez JE, Chapman SW, Horowitz HE, Zervos M, McKinsey D, Lee J, Babinchak T, Bradsher RW, Cleary JD, Cohen DM, Danziger L, Goldman M, Goodman J, Hilton E, Hyslop NE, Kett DH, Lutz J, Rubin RH, Scheld WM, Schuster M, Simmons B, Stein DK, Washburn RG, Mautner L, Chu TC, Panzer H, Rosenstein RB, Booth J for the Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (2003). A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. *Clin Infect Dis.* 36: 1221-8

80. Sandven P, Bevanager L, Digranes A, Haukland HH, Mannsaker T, Gaustad P, and the Norwegian Yeast Study Group (2006). Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1977-81
81. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G (2005). Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 668-79
82. Segal BH, Kwon-Chung J, Walsh TJ, Klein BS, Battiwalla M, Almyroudis NG, Holland SM, Romani L (2006). Immunotherapy for fungal infections. *Clin Infect Dis.* 42: 507-15
83. Seifert H, Aurbach U, Stefanik D, Cornely O (2007). In vitro activities of isavuconazole and other antifungal agents against *Candida* bloodstream isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 1818-21
84. Sobel JD, Kapernick PS, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, Heine MW, Willems J, Panzer H, Wittes H (2001). Treatment of complicated *Candida* vaginitis: comparison of single and sequential doses of fluconazole. *Am J Obstet Gynecol.* 185: 363-9
85. Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G (1986). Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis.* 154: 76-83
86. Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE (2006). Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis.* 42: 244-51
87. Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, Prigitano A, Viviani MA, and the FIMUA-ECMM Candidemia Study Group (2003). The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-albicans *Candida* isolates from blood. *J Antimicrob Chemother.* 52: 679-82
88. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP and the National Nosocomial Infectious Surveillance System Hospitals (2002). Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis.* 35: 622-30
89. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, Greinix H, Morais de Azevedo W, Reddy V, Boparai N, Pedicone L, Patino H, Durrant S (2007). Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med.* 356: 335-47
90. Villanueva A, Arathoon EG, Gotuzzo E, Berman RS, DiNubile MJ, Sable CA (2001). A randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin for the treatment of candidal oesophagitis. *Clin Infect Dis.* 33: 1529-35

91. Walsh TJ. (2002). Echinocandins - an advance in the primary treatment of invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 347:2070-2
92. Walsh TJ, Melcher GP, Rinaldi MG, Lecciones J, McGough DA, Kelly P, Lee J, Callender D, Rubin M, Pizzo PA (1990). *Trichosporon beigeli*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J Clin Microbiol.* 28: 1616-22
93. Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH (1995). Comparison of E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 2520-2
94. Warnock DW, Johnson EM, Rogers TRF on behalf of the BSAC Working Party on Antifungal Chemotherapy (1998). Multi-center evaluation of the E-test method for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrob Chemother.* 42: 321-31
95. Wingard JR (2002). Lipid formulations of amphotericins: are you a lumper or a splitter?. *Clin Infect Dis.* 35: 891-95
96. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 39: 309-17

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.