

Aus der Abteilung Medizinische Mikrobiologie
(Prof. Dr. med. U. Groß)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

***Candida*-Blutkulturerisolate in Deutschland und Österreich**

**Spektrum, Klinik und Empfindlichkeit
gegenüber sechs ausgewählten Antimykotika**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Kerstin Kumm
aus
Göttingen

Göttingen 2008

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. M. Borg-von Zepelin

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material	4
2.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	4
2.2 Antimykotika	5
2.3 Geräte	6
2.4 Herkunft der Referenzstämme	8
2.3 Herkunft der <i>Candida</i> -Isolate	8
3. Methoden	12
3.1 Kultur-/ Nährmedien und Suspensionslösungen	12
3.1.1 Physiologische Kochsalzlösung	12
3.1.2 Sabouraud-Agar	12
3.1.3 RPMI-Medium	13
3.2 Lagerung der Hefeisolate	14
3.3 Mikrodilutionstest	15
3.3.1 Inokulum	15
3.3.1.1 Ausgangssuspension	15
3.3.1.2 Endverdünnung	15
3.3.1.3 Etablierung und Qualitätskontrolle	15
3.3.2 Herstellung der Antimykotika-Stammlösungen	16
3.3.2.1 Fluconazol	16
3.3.2.2 Amphotericin B, Itraconazol, Voriconazol	16
3.3.2.3 Caspofungin	16
3.3.2.4 5-Fluorcytosin	16
3.3.3 Herstellung der Verdünnungsreihen	17
3.3.3.1 Herstellung der Fluconazolverdünnungsreihe	18
3.3.3.2 Amphotericin B, Itraconazol, Voriconazol	19
3.3.3.3 Caspofungin	19
3.3.3.4 5-Fluorcytosin	19
3.3.4 Beschickung der Mikrottestplatten	20
3.3.4.1 Beschickung der Mikrottestplatten mit der Antimykotikaverdünnung	21

3.3.4.2 Beschickung der Mikrottestplatten mit den <i>Candida</i> -Isolaten	22
3.3.5 Inkubation	23
3.3.6 Ablesen der Ergebnisse	23
3.3.7 Beurteilung der Ergebnisse	25
3.3.7.1 Fluconazol	25
3.3.7.2 Amphotericin B	25
3.3.7.3 Itraconazol	25
3.3.7.4 Voriconazol	25
3.3.7.5 Caspofungin	26
3.3.7.6 5-Fluorcytosin	26
3.4 Qualitätskontrollen	27
4. Ergebnisse	28
4.1 Etablierung der Mikrodilutions-Methode nach CLSI	28
4.1.1 Einsaat	28
4.1.2 Lösungsmittel für Antimykotika	31
4.1.3 Glucosekonzentration des RPMI-Mediums	32
4.1.4 Mikrottestplatten	34
4.1.5 Inkubationszeit	36
4.1.6 Vorbereitung der Platten zur photometrischen Messung	39
4.1.7 Ergebnisinterpretation	39
4.2 Statistische Auswertung der Fragebögen	43
4.2.1 Altersverteilung	43
4.2.2 Risikofaktoren	45
4.2.3 Speziesverteilung	52
4.2.4 Speziesverteilung in Bezug auf das Patientenalter	53
4.3 Ergebnisse der Mikrodilutionstestung	55
4.3.1 Fluconazol	55
4.3.1.1 <i>Candida albicans</i>	55
4.3.1.2 <i>Candida glabrata</i>	55
4.3.1.3 <i>Candida tropicalis</i>	56
4.3.1.4 <i>Candida parapsilosis</i>	56
4.3.1.5 Seltene Spezies	56
4.3.1.6 Zusammenfassung Fluconazol	57

4.3.2 Itraconazol	60
4.3.2.1 <i>Candida albicans</i>	60
4.3.2.2 <i>Candida glabrata</i>	60
4.3.2.3 <i>Candida tropicalis</i>	61
4.3.2.4 <i>Candida parapsilosis</i>	61
4.3.2.5 Seltene Spezies	61
4.3.2.6 Zusammenfassung Itraconazol	62
4.3.3 Voriconazol	65
4.3.3.1 <i>Candida albicans</i>	65
4.3.3.2 <i>Candida glabrata</i>	65
4.3.3.3 <i>Candida tropicalis</i>	66
4.3.3.4 <i>Candida parapsilosis</i>	66
4.3.3.5 Seltene Spezies	66
4.3.3.6 Zusammenfassung Voriconazol	67
4.3.4 Co-Resistenzen bei den Azolen	70
4.3.5 Amphotericin B	72
4.3.5.1 <i>Candida albicans</i>	72
4.3.5.2 <i>Candida glabrata</i>	72
4.3.5.3 <i>Candida tropicalis</i>	73
4.3.5.4 <i>Candida parapsilosis</i>	73
4.3.5.5 Seltene Spezies	73
4.3.5.6 Zusammenfassung Amphotericin B	74
4.3.6 5-Fluorcytosin	77
4.3.6.1 <i>Candida albicans</i>	77
4.3.6.2 <i>Candida glabrata</i>	77
4.3.6.3 <i>Candida tropicalis</i>	78
4.3.6.4 <i>Candida parapsilosis</i>	78
4.3.6.5 Seltene Spezies	78
4.3.6.6 Zusammenfassung 5-Fluorcytosin	79
4.3.7 Caspofungin	82
4.3.7.1 <i>Candida albicans</i>	82
4.3.7.2 <i>Candida glabrata</i>	82
4.3.7.3 <i>Candida tropicalis</i>	82
4.3.7.4 <i>Candida parapsilosis</i>	83

4.3.7.5 Seltene Spezies	83
4.3.7.6 Zusammenfassung Caspofungin	83
4.4 Resistenztestung deutscher und österreichischer <i>Candida</i> -Stämme	86
5. Diskussion	89
6. Zusammenfassung	101
7. Literaturverzeichnis	103

Abkürzungsverzeichnis

Es werden die nach dem internationalen Einheitssystem vereinbarten Basiseinheiten verwendet (SI-Einheiten). Geläufige Zeichen und Abkürzungen sind in der Liste nicht aufgeführt.

Aqua (bi-)dest.	(zweimalig) destilliertes, demineralisiertes Wasser
ASM	American Society for Mikrobiology
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (ehemals NCCLS)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECMM	European Confederation of Medical Mycology
EUCAST	European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing
McF	Standard-McFarland-Trübungsmesswert
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure (C ₇ H ₁₅ NO ₄ S)
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards (= CLSI)
NRZSM	Nationales Referenzzentrum für systemische Mykosen (Göttingen)
OD	Optische Dichte von Trübungsmesswerten
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 2.1	10 - 11	Tab. 2.1	9
Abb. 4.1	30	Tab. 3.1	21
Abb. 4.2	33	Tab. 3.2	22
Abb. 4.3	35	Tab. 3.3	27
Abb. 4.4	37	Tab. 4.1	29
Abb. 4.5	38	Tab. 4.2	33
Abb. 4.6	41	Tab. 4.3	44
Abb. 4.7	41	Tab. 4.4	47
Abb. 4.8	42	Tab. 4.5	49
Abb. 4.9	54	Tab. 4.6	51
Abb. 4.10	58	Tab. 4.7	52
Abb. 4.11	59	Tab. 4.8	87
Abb. 4.12	63	Tab. 4.9	88
Abb. 4.13	64		
Abb. 4.14	68		
Abb. 4.15	69		
Abb. 4.16	71		
Abb. 4.17	75		
Abb. 4.18	76		
Abb. 4.19	80		
Abb. 4.20	81		
Abb. 4.21	84		
Abb. 4.22	85		

1. Einleitung

Die Inzidenz von systemischen Pilzinfektionen hat in den letzten zwanzig Jahren kontinuierlich zugenommen (Pfaller und Diekema 2007). Verantwortlich dafür ist die durch klinische Fortschritte deutlich erhöhte Lebenserwartung von besonders infektionsgefährdeten Patienten auf Intensivstationen, unter immunsuppressiver oder chemotherapeutischer Behandlung, nach Organtransplantation und nach großen chirurgischen Eingriffen. Bei diesen Patienten ist wiederum die Therapie und die Diagnose invasiver Mykosen durch die oft fulminanten Verläufe deutlich erschwert, so dass viele von ihnen letztendlich nicht an ihrer schweren Grunderkrankung, sondern an einer systemischen Pilzinfektion versterben. *Candida*-Spezies sind in den meisten Fällen Auslöser systemischer Mykosen, sie stellen in den USA mit 8% bis 15% die vierthäufigste Ursache aller nosokomialen Blutinfektionen dar (Jarvis 1995, Edmond et al. 1999, Wisplinghoff et al. 2004). Noch besorgniserregender stellt sich jedoch der klinische Verlauf dieser Candidämien dar; sie wiesen mit 25% bis 38% die mit Abstand höchste Mortalitätsrate aller nosokomialen Infektionen auf (Wey et al. 1988, Wenzel und Edmond 2001).

Die Studien zur Epidemiologie und Resistenzlage systemischer *Candida*-Infektionen kommen überwiegend aus den USA (Baran et al. 2001, Diekema et al. 2002, Hajjeh et al. 2004, Kao et al. 1999, Nguyen et al. 1996, Pfaller und Diekema 2002, Rangel-Frausto et al. 1999, Trick et al. 2002). Aus Lateinamerika existieren nur wenige Publikationen aus einzelnen Staaten wie Argentinien (Cuenca-Estrella et al. 2002) und Brasilien (Colombo et al. 1999) und Daten die innerhalb großer, internationaler Studien gesammelt wurden (Pfaller et al. 2000, Pfaller et al. 2001). Eine australische Studie wurden von Stratov et al. (1998) veröffentlicht.

Publizierte Daten aus Europa sind oft entweder auf kleinere Regionen ausgelegt (Almirante et al. 2005, Boo et al. 2005, Borg-von Zepelin et al. 1993, Cuenca-Estrella et al. 2005, Garbino et al. 2002, Kibbler et al. 2003, Knoke et al. 1997, Martin et al. 2005, McMullan et al. 2002, Rüchel et al. 2002, Schelenz und Gransden 2002, Yapar et al. 2005), oder auf spezifische Patientengruppen beschränkt (Geffers et al. 2004, Schwesinger et al. 2005). Nationale Studien zur *Candida*-Epidemiologie existieren nur für einige europäische Staaten (Ásmundsdóttir et al. 2002, Klingspor et al. 2004, Sandven et al. 2006, Krcmery

und Kovacicova 2000, Lyytikäinen et al. 2002, Marchetti et al. 2004, Poikonen et al. 2003, Richet et al. 2002). Auffällig sind die großen Abweichungen der epidemiologischen Daten und auch der Resistenzraten zwischen den einzelnen geographischen Regionen. Das Verhältnis der *Candida-albicans*-Isolate zu den nicht-*albicans*-Isolaten hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten zugunsten der nicht-*albicans*-Isolate verschoben (Pfaller und Diekema 2007). *Candida albicans* ist und bleibt zwar weltweit die dominierende Spezies, jedoch variiert ihr Anteil von 37% in Brasilien (Colombo et al. 1999) bis zu 70% in Norwegen (Sandven et al. 2006). Unter den nicht-*albicans*-Spezies gelten *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* und *Candida tropicalis* als die drei häufigsten Spezies. Auch hier sind Reihenfolge und Anteil regional sehr unterschiedlich. So ist *Candida glabrata* mit bis zu 22% in Nordamerika die zweithäufigste Spezies (Pfaller et al. 2006a) und steht dagegen mit 6% in Lateinamerika nur an vierter Stelle (Pfaller et al. 2001). Auch innerhalb Europas gibt es große regionale Unterschiede. So liegt zum Beispiel in Dänemark der *Candida-albicans*-Anteil bei 63% gefolgt von 20% *Candida-glabrata*- und jeweils 4% *Candida-parapsilosis*- und *Candida-tropicalis*-Isolaten (Arendrup et al. 2005). Spanien weist dagegen *Candida-albicans*-Raten von 47% gefolgt von 19% *Candida parapsilosis*, 12% *Candida glabrata* und 10% *Candida tropicalis* auf (Cuenca-Estrella et al. 2006).

Um einen Überblick über die Lage in ganz Westeuropa zu gewinnen, wurde 1997 im Rahmen der ECMM eine Studie aufgelegt. Durch diese Studie wurde von September 1997 bis Dezember 1999 ein epidemiologisches und mykologisches Profil für Candidämien in allen wichtigen Patientengruppen erstellt (Tortorano et al. 2004 und 2006).

Für Deutschland existierten bis zum heutigen Zeitpunkt nur wenige, lokale, sehr alte oder auf bestimmte Patientengruppen bezogene Candidämie-Studien (Borg-von Zepelin et al. 1993, Dermoumi 1987, Geffers et al. 2004, Knoke et al. 1997, Rüchel et al. 2002). Die Evaluation und ständige Aktualisierung der spezifischen *Candida*-Epidemiologie und die Testung der Resistenzlage für jedes Land sind jedoch essentiell, um im klinischen Alltag gezielt und regionalen Besonderheiten angepasst reagieren zu können.

Durch das Nationale Referenzzentrum für systemische Mykosen (NRZSM) wurden jetzt erste Daten über *Candida*-Epidemiologie und Resistenzlage in Deutschland veröffentlicht (Borg-von Zepelin et al. 2007).

Eine Momentaufnahme der *Candida*-Epidemiologie in Deutschland ist jedoch noch nicht ausreichend. Die weltweit steigende Inzidenz von Pilzinfektionen und das erweiterte Spektrum neuer Antimykotika haben dazu geführt, dass der Einsatz antimykotischer Substanzen im klinischen Alltag stark zugenommen hat. Diese breite Nutzung von antimykotischen Substanzen zur Therapie und Prophylaxe trägt wiederum zur Entwicklung von antimikrobiellen Resistenzen bei und fördert die Selektion von primär resistenten *Candida*-Spezies (Baran et al. 2001, Jarvis 1995, Pfaller et al. 2000). Um also Trends in der Speziesverteilung, im betroffenen Patientengut und in der Resistenzentwicklung gegen die wichtigen Antimykotika erkennen zu können, ist der Vergleich mit Candidämie-Daten aus früheren Zeiten essentiell.

Ziel meiner Arbeit ist es,

1. den von der CLSI festgelegten Test zur Resistenztestung von Hefen (National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002) für das NRZSM zu etablieren. Außerdem müssen Schwierigkeiten, die dieses Verfahren mit sich bringt, erkannt und beschrieben werden, um Vorzüge und Grenzen des Tests klar einschätzen zu können.
2. die in der ECMM-Studie erhobenen deutschen und österreichischen Daten aus den Jahren 1997-1999 (Bernhardt et al. 2000) aufzuarbeiten und die Isolate auf Resistenzen gegen sechs gängige Antimykotika neu zu testen.

Damit wird der Grundstock an Informationen zur Erkennung von Veränderungen in der Speziesverteilung und Resistenzentwicklungen für die deutsche *Candida*-Epidemiologie gelegt.

2. Material

2.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Biochrom & KG, Berlin

Instamed - Medium RPMI 1640

Copan Diagnostics, Corona, CA, USA

Sterile Wattetupfer

J. T. Baker, Deventer, Niederlande

Methanol

Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld

Cryobank Stammhaltungssystem

Merck & Co, Inc., Whitehouse Station, USA

DMSO

Glucose

Natriumchlorid

Sabouraud - 4% Glucose – Agar

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

MOPS \geq 99,5% Puffer

2.2 Antimykotika

Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Reinsubstanz 5-Fluorcytosin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Reinsubstanz Amphotericin B

Die Reinsubstanzen der restlichen vier Antimykotika wurden von den folgenden Unternehmen freundlichst zur Verfügung gestellt:

MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar

Caspofungin, Reinsubstanz

Ortho Biotech, Neuss

Itraconazol, Reinsubstanz

Itraconazol (hydrophiles Derivat), Reinsubstanz

Pfizer GmbH, Karlsruhe

Fluconazol, Reinsubstanz

Voriconazol, Reinsubstanz

2.3 Geräte

Bio-Mérieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich

Densimat Mc-Farland-Photometer

Brand, Wertheim

Glaspipette 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml

Glas-Pasteurpipetten

Transferpette® 8 x 20 – 200 µl

Cooke Engineering Company, Alexandria, VA, USA

Ablese Spiegel "Microtiter" für Mikrotiterplatten

Corning Incorporated, Corning, NY, USA

Bottle Top Polyethylensulfon-Filter 0,22 µm

Dechney Plastic Packing, Chicago, IL, USA

Parafilm M

Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA

MR x TC Revelation Photometer mit 630 nm Filter

Fa Eppendorf, Hamburg

Research Pipette 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl

Mehrkanal Research Pipette 30 – 300 µl

Multipette plus

Combitips plus 5 ml

Flow Laboratories GmbH, Meckenheim

Sterile Werkbank (Laminar Flow) Gelaire HF 48

Greiner GmbH, Frickenhausen

96-Loch Mikrotiterflachbodenplatten

PS-Abdeckplatten

PP – test tubes cellstar 15 ml, 50 ml

Hirschmann Laborgeräte

Pipetus - Akku

Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau

Magnetrührer IKA – Combimag Reo

Kern & Sohn GmbH, Balingen / Frommern

Waage Typ 572

KNF Neuberger, Freiburg

Vakuumpumpe

Memmert GmbH + CoKG, Schwabach

Brutschrank BE 600

Rettberg, Göttingen

Flachbodengläser Fiolax 80 x Ø17,75 x 0,55 mm

Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl

Impfschlinge 1 µl, 10 µl

Scaltec, Heiligenstadt

Feinwaage SBC 33

Schott AG, Mainz

Glasflaschen Duran 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml

Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen

Ph-Meter ph 526

Bunsenbrenner flammy S

Scientific Industry, Bohemia, NY, USA

Vortex Genie 2

2.4 Herkunft der Referenzstämme

Als Referenzstämme wurden Reinkulturen der Isolate *C. krusei* ATCC 6258 und *C. parapsilosis* ATCC 20019 verwendet. Sie stammten ursprünglich aus der American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, USA) waren aber im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen vorrätig eingelagert. Anhand der Referenzbereiche dieser Stämme wurde die Mikrodilutionstestung mit den einzelnen Antimykotika etabliert. Zur Qualitätskontrolle wurden beide Isolate bei jedem späteren Versuchsansatz mitgetestet.

2.5 Herkunft der *Candida*-Isolate

Die insgesamt 227 *Candida* Stämme waren Isolate aus Blutkulturen, einem primär sterilen Material im Patienten. Sie wurden von September 1997 bis Dezember 1999 im Rahmen der ECMM-Studie gesammelt (Kibbler et al. 2003, Tortorano et al. 2003, 2004 und 2006). 149 Isolate stammten aus elf deutschen Zentren, wobei das Institut für Medizinische Mikrobiologie in Köln mit 44 Stämmen, gefolgt vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Greifswald mit 26 Stämmen die meisten Isolate beisteuerten. Die restlichen 78 Stämme wurden aus drei österreichischen Kliniken eingesandt, wobei der Großteil von 63 Proben aus der Abteilung Klinische Mikrobiologie des Hygiene Instituts der Universität Wien stammte. Die anfallenden Isolate der 14 ausgewählten deutschen und österreichischen Kliniken wurden in deren eigenen Laboratorien, die in Tabelle 2.1 genau aufgelistet sind, erstmalig mit Routinemethoden differenziert. Von dort wurden sie nach Greifswald geschickt, wo die Differenzierung verifiziert wurde. Dabei wurde die Morphologie und Physiologie der Isolate untersucht. Zum Beispiel wurden die Fermentation von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und das Wachstum bei verschiedenen Temperaturen getestet. Auch molekular-biologische Techniken und industriell vorgefertigte Differenzierungsschnelltests (Api 32 C aux) wurden eingesetzt. In der Abteilung für medizinische Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität wurden die Isolate mittels des Cryobank-Stammhaltungssystems bei -20°C gelagert.

Zu Beginn meiner Arbeit wurden die Isolate aufgetaut und auf Sabouraud-Schrägagar angezüchtet. In diesen erfolgte der Transport in die Medizinische

Mikrobiologie der Georg-August-Universität Göttingen. Dort wurden Einzelkolonien der Isolate auf Sabouraud-Agarplatten überimpft und bei 35°C bebrütet. Die maximal 24 Stunden alten Reinkulturen konnten dann per Cryobank-Stammhaltungssystem erneut bei -27°C eingelagert werden. Alle 227 Isolate wurden dem Mikrodilutionstest unterzogen.

Zu jeder Probe wurde von den Kliniken ein Fragebogen ausgefüllt, der Informationen über Risikofaktoren oder prädisponierendes Grundleiden des Patienten, intravasale Katheterisierung, vorangegangene Antibiose, Cortison- oder Chemotherapie, Diagnose der Candidämie, die initiale Therapie und den Verlauf nach 30 Tagen, sowie allgemeine Patientendaten wie Initialen, Geschlecht und Alter enthielt.

Der vollständige Fragebogen ist in Abb. 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Herkunft der Isolate in Deutschland und Österreich mit Angabe des mit der Erstidentifizierung beauftragten mikrobiologischen Labors und der Anzahl der jeweils eingesandten Stämme.

Ort	Institut	Isolate
Berlin	Institut für Medizinische Diagnostik	8
	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité	4
Düsseldorf	Institut für Medizinische Mikrobiologie	10
Frankfurt a.M.	Universitätsklinik, Abteilung Mikrobiologie	16
Göttingen	Zentrum für Hygiene und Humangenetik der Medizinischen Fakultät	8
Greifswald	Institut für Medizinische Mikrobiologie der E.-M.-Arndt Universität	26
Köln	Institut für Medizinische Mikrobiologie	44
Mainz	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene	3
München	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU	14
Potsdam	Praxisgemeinschaft Laboratoriumsmedizin	5
Würzburg	Institut für Hygiene und Mikrobiologie	11
Graz	Hygiene-Institut d. Universität	9
Wels	Institut f. Pathologie II, Allgemeines öffentliches Krankenhaus der Barmherzigen Schwestern vom Heiligen Kreuz	6
Wien	Abt. Klinische Mikrobiologie des Hygiene-Instituts der Universität	63

EPIDEMIOLOGISCHER SURVEY ZUR CANDIDÄMIE In DEUTSCHLAND / ÖSTERREICH

(Candida & Torulopsis species and their perfect form)

im Rahmen des Suveys "Candidemia in Europe" der ECMM*)

Koordinatorin: Prof. Dr. H. Bernhardt, Abteilung für Klinische Mikrobiologie

Klinik für Innere Medizin der Universität Greifswald, Fr.-Loeffler-Str. 23a, 17489 Greifswald

Tel.: 03834/86 6663, Fax: 03834/86 6631, E-mail: dmykbern@rz.uni-greifswald.de

PATIENT DETAILS *report first 3 and 2 letters of the names*

Family name |_|_|_| First name |_|_| Year of birth |_|_|_|_| Sex: M F
Country & city of residence Hospitalization date d/m/y.....

RISK FACTOR/PREDISPOSING DISEASE *check all boxes needed*

- General surgery *site of surgery*date d/m/y
- Organ transplant *specify organ*date d/m/y
- Burn % of burned body surfacedate d/m/y
- HIV infection (CD4/mm³.....)
- Fetal immaturity birth weight weeks of gestation
- Intensive care date of admission in ICU d/m/y single/ multiple bedroom
- Antibiotics given within 2 weeks prior to blood yeast detection IV PO
type(s)/total dose.....
- Corticosteroids given at any time during the month prior to the yeast detection in blood (exclude given with amphotericin B) *specify reason*
type(s)/total dose.....
- Hematological disease/solid tumor *specify*diagnosed d/m/y
- Disease stage at time of candidemia: onset complete/ partial remission
 resistant relapse other *specify*
- Last therapy for underlying disease:
 1st/ 2nd line chemotherapy auto/ allo BMT
 maintenance other *specify*
- Radiotherapy/ surgery within 1 month prior candidemia (last done d/m/y
- Other *specify*

DIAGNOSIS OF CANDIDEMIA *check all boxes needed*

Date of the first positive blood culture d/m/y 1st episode relapse

Blood puncture from catheter vein

Blood culture system on which candidemia was diagnosed

- Lysis centrifugation
- Bactec systemmedium
- other systemmedium
- combination *specify*

Species identified Other fungus/bacteria isolated *specify*

Date of the last positive blood culture d/m/y

Total number of positive blood cultures/total number of blood cultures /

OTHER CANDIDEMIA INFORMATION *check all boxes needed*

IV line

IV line in situ at time of the first positive blood culture no yes

central venous catheter peripheral date of IV line placement *d /m /y*

IV line removed after the diagnosis of candidemia no yes

Catheter cultured no yes negative yes positive

same yeast species other fungus/bacteria

Clinical & biological signs at time of candidemia

Shock related to candidemia

Organ involvement *specify organ*

Documented: clinically histologically by X-ray, CTscan, NMR

White blood cell count/mm³

Candidemia associated with:

seroconversion increasing of antibody titre (>2 dilutions)/ bands

antigenemia *specify test and titre*

Candida colonization, due to the same species, detected within 2 weeks prior to outcome of candidemia on

oral mucosa resp. tract GI tract GU tract vagina skin

not done not done not done not done not done not done

other *specify*

Antifungal(s) given within 2 weeks prior to candidemia: *reason*

type of antifungal..... PO IV daily dose

Initial treatment of candidemia

amphotericin B 5-fluorocytosine fluconazole itrconazole

other: daily dose

Outcome (day 30): survival candidemia related complications death

CORRESPONDING CLINICAN/MYCOLOGIST *indicate name, address, phone and fax no, e-mail address*

.....

.....

.....

SIGNATURE DATE

Please, return the form together with the strain (first isolate) to your country's coordinator.

Abbildung 2.1: Begleitschein für die Isolate der ECMM-Studie (Tortorano et al. 2004)

3. Methoden

3.1 Kultur-/ Nährmedien und Suspensionslösungen

3.1.1 Physiologische Kochsalzlösung

Die physiologische Kochsalzlösung zur Herstellung der Hefesuspension im Rahmen der Mikrodilutionstests wurde durch die Mitarbeiter der Nährbodenküche des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Georg-August Universität Göttingen bereitgestellt. Für einen Liter 0,9%iger Kochsalzlösung wurden 9g Natriumchlorid in 1l Aqua dest. gelöst. Die Sterilisation erfolgte nach dem Abfüllen in 100-ml-Glasflaschen durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C. Bis zum Verbrauch wurden die Flaschen bei 8°C im keimarmen Kühlraum des Institutes gelagert.

3.1.2 Sabouraud-Agar

Der Sabouraud-Agar zur Anzüchtung der Hefeisolate wurde von den Mitarbeitern der Nährbodenküche des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Georg-August Universität Göttingen zubereitet. Zur Herstellung eines Liters wurden folgende Zutaten verwendet: 10g Pepton, 40g Glucose, 15g Agar-Agar. Bei 25°C wurde der pH-Wert auf $5,6 \pm 0,2$ eingestellt. Die Lösung mit 1l Aqua bidest. wurde bei 121°C 15 Minuten autoklaviert. Nach ausreichendem Abkühlen wurde 1ml Gentamycin bzw. Chloramphenicol hinzugefügt. Jeweils 20ml des noch flüssigen Agar wurden auf eine Petrischale gegeben und zum Aushärten in einem Sterilarbeitsraum gelagert. Die Höhe der Agar-Schicht in den Petrischälchen betrug nach der Aushärtung $4,0\text{mm} \pm 0,5\text{mm}$. Bis zum Verbrauch wurden die fertigen Agarplatten mit Deckel in sterilen Plastiksäcken bei 8°C im keimarmen Kühlschrank des Institutes gelagert.

3.1.3 RPMI-Medium

Das RPMI-Medium für die Mikrodilution wurde von den Mitarbeitern der Nährbodenküche des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Georg-August Universität Göttingen zubereitet. Bis auf die Verdopplung der Glukosekonzentration wurde streng nach den CLSI-Leitlinien verfahren. Für die Herstellung von einem Liter RPMI-Medium wurden 10,43g RPMI-Trockenmedium (mit L- Glutamin und 2g, entspr. 0,2% Glucose; ohne Bikarbonat) in 900ml Aqua bidest. gelöst. Dann wurden 34,52g MOPS hinzugefügt, so dass die Endkonzentration in der Lösung 0,165mol/l betrug. Es wurden weitere 2g Glucose hinzugefügt, so dass die Endkonzentration mit der im RPMI-Medium enthaltenen Glucose 0,4% ergab.

Zum Schluss wurde der pH-Wert des Mediums mit 1 molarer NaOH-Lösung bei 25°C auf 7,0 eingestellt. Durch Zusatz von Aqua bidest. wurde die Lösung auf ein Volumen von einem Liter aufgefüllt. Dann wurde die Lösung abschließend per Vakuumpumpe durch einen Filter mit einer Porengröße von 22µm sterilfiltriert und in sterile, autoklavierte 200-, 500- und 1000-ml-Glasflaschen abgefüllt. Bis zum Verbrauch wurde das Medium bei 8°C im keimarmen Kühlschrank des Institutes gelagert.

3.2 Lagerung der Hefeisolate

Die Hefeisolate wurden mit Hilfe des industriell vorgefertigten Cryobank-Stammhaltungssystems eingelagert. Dieses besteht aus Kunststoffröhrchen, die mit jeweils 25 für bessere Oberflächenadhärenz chemisch behandelten Glaskügelchen und 1ml einer Konservierungslösung bestückt sind. Die Röhrchen sind mit Hilfe eines farblich markierten Drehdeckels zu verschließen und beschreibbar.

Kulturen der einzelnen Hefeisolate wurden auf Sabouraud-Agarplatten ausgestrichen und bei 35°C im Wärmerraum des Institutes bebrütet. Nach 24 bis maximal 48 Stunden wurden in keimarmer Umgebung ca. fünf Kolonien der frischen Reinkultur mittels einer sterilen Einwegimpföse abgenommen. Mit der Impföse wurden die Zellen in ein vorher genau beschriftetes Kunststoffröhrchen eingebracht. Die Suspension der Zellen führte zu einer Trübung der Konservierungslösung, entsprechend einem Standard-McFarland-Trübungsmesswert von 3,0 bis 4,0. Nach Verschluss des Röhrchens wurden die Zellen durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Damit konnte eine gleichmäßige Adhäsion an den Glaskügelchen erreicht werden. Danach wurde die Konservierungslösung mit einer 1000- μ l-Pipette möglichst vollständig abgezogen. Die Lagerung der gut verschlossenen und nach Probennummer sortierten Röhrchen erfolgte in den dafür vorgesehenen Ständern in Pappschachteln á 64 Röhrchen bei -27°C.

Zur Rekultivierung der einzelnen Proben wurden die jeweiligen Röhrchen auf einem Eisbett gelagert, um ein Auftauen der Organismen zu verhindern. Einzelne Glaskügelchen konnten dann mit Hilfe eines sterilen, abgeflamnten Drahtes aus dem Röhrchen entnommen und auf Sabouraud-Agarplatten ausgestrichen werden. Die Inkubation über 24 bis maximal 48 Stunden erfolgte wiederum bei 35°C im Brutraum des Institutes.

3.3 Mikrodilutionstest

3.3.1 Inokulum

Die Präparation des Inokulums erfolgte entsprechend den Leitlinien des CLSI. Es wurden jeweils nur Reinkulturen verwendet, die bei 35°C inkubiert und nicht älter als 24 bis 48 Stunden waren.

3.3.1.1 Ausgangssuspension

Je nach Koloniegröße wurden drei bis fünf einzelne Kolonien mittels einer sterilen Einwegimpföse von der Agarplatte abgenommen und in steriler Kochsalzlösung gelöst. Die Trübung wurde mit einem Densimat-McFarland-Photometer bestimmt. Durch Suspension von mehr Hefezellen oder Verdünnung mit mehr steriler Kochsalzlösung wurde abhängig von der Spezies eine Standard-McFarland-Trübungsmessung von 0,3 für *C. glabrata* bzw. 1,0 für alle anderen *Candida spp.* eingestellt. Die Einsaat lag durch diese Methode bei 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen pro Milliliter Suspension.

3.3.1.2 Endverdünnung

Die Ausgangssuspension wurde durch Zusatz von steriler Kochsalzlösung im Verhältnis von 1:100 und anschließend mit RPMI-Medium im Verhältnis von 1:20 weiter verdünnt. Das Inokulum hatte eine Endkonzentration von 5×10^2 bis $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Milliliter. Es wurde unmittelbar nach der Herstellung zur Beschickung der Mikrottestplatten verwendet.

3.3.1.3 Etablierung und Qualitätskontrolle

Zur Etablierung der nötigen Standard-McFarland-Einstellungen und zur weiteren regelmäßigen stichprobenartigen Kontrolle der Einsaat wurde wie folgt vorgegangen.

Von der Zellsuspension einer Probe wurden zweimal 50µl entnommen und auf je einer Sabouraud-Platte gleichmäßig verteilt. Nach 24 bis maximal 48 stündiger Bebrütung bei 35°C im Brutraum des Institutes konnten die gewachsenen Einzelkolonien per Auge ausgezählt werden. Die mittlere Anzahl der koloniebildenden Einheiten auf den zwei Platten ergab die Zahl der ursprünglich in den 50µl Inokulum gelösten Hefezellen. Sie wurde auf 1ml hochgerechnet und mit der in den Leitlinien des CLSI empfohlenen Einsaat von 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen pro Milliliter abgeglichen.

3.3.2 Herstellung der Antimykotika-Stammlösungen

Neben den standardmäßig in der Klinik verwendeten Azolen Fluconazol und Itraconazol wurde zusätzlich gegen Voriconazol, eines der neueren Antimykotika aus der Gruppe der Azole, getestet. Außerdem wurde Amphotericin B aus der Gruppe der Polyene, 5-Fluorcytosin als Basenanalogen und Caspofungin als erstes zugelassenes Echinokandin eingesetzt. Für jedes Antimykotikum wurde entsprechend der Leitlinien des CLSI eine Stammlösung angesetzt. Die Lagerung der Stammlösung erfolgte bei -27°C.

3.3.2.1 Fluconazol

Für die Stammlösung wurden in einem Eppendorfröhrchen 25,6mg Reinsubstanz in 1ml Methanol gelöst. Die Fluconazolkonzentration entsprach somit 25.600µg/ml. Entgegen den Richtlinien des CLSI wurde nicht Aqua bidest. als Lösungsmittel eingesetzt. Wegen der schon bei Schmalreck und Fegeler (1996) beschriebenen besseren Löslichkeit wurde stattdessen Methanol verwendet.

3.3.2.2 Amphotericin B, Itraconazol, Voriconazol

Für die Stammlösung wurden 4,8mg der jeweiligen Reinsubstanz in 3ml DMSO gelöst. Die Antimykotikakonzentrationen entsprachen somit 1600µg/ml. Zur Vermeidung von Konzentrationsschwankungen durch Adhäsion der lipophilen Antimykotika an Plastikoberflächen wurden für die Herstellung der Stammlösung, sowie für die weitere Lagerung und Verdünnung bis zur Bestückung der Mikrotiterplatten ausschließlich Glasgefäße verwendet.

3.3.2.3 Caspofungin

Für die Stammlösung wurde in Eppendorfröhrchen 4,8mg Reinsubstanz in 3ml Aqua bidest. gelöst. Die Caspofunginkonzentration in der Stammlösung entsprach somit 1600µg/ml. Wegen der Lichtempfindlichkeit von Caspofungin wurden die verwendeten Gefäße der Reinsubstanz wie auch sämtlicher Lösungen mit Aluminiumfolie lichtundurchlässig bezogen.

3.3.2.4 5-Fluorcytosin

Für die Stammlösung wurden 12,8mg Reinsubstanz in Eppendorfröhrchen in 1ml Aqua bidest. gelöst. Die 5-Fluorcytosinkonzentration entsprach somit 12800µg/ml.

3.3.3 Herstellung der Verdünnungsreihen

Die Präparation der Antimykotikalösungen in den unterschiedlichen Konzentrationsstufen wurde nach den Leitlinien des CLSI durchgeführt.

Eine Verdünnungsreihe bestand aus zehn Verdünnungsstufen. Die Konzentration des Antimykotikums halbierte sich von Stufe zu Stufe.

Um in den niedrigen Konzentrationsstufen mit pipettierbaren Mengen an Antimykotikalösung arbeiten zu können, musste ab der vierten Konzentrationsstufe eine Vorverdünnungsreihe erstellt werden. Nach CLSI Empfehlung sollten aus einer Stammlösung maximal zwei direkte Verdünnungen erstellt werden.

Die Vorverdünnung wurde mit den geeigneten Verdünnungsmedien durchgeführt. Für die in DMSO gelösten Antimykotika wurde DMSO, für die in Aqua bidest. oder Methanol gelösten Antimykotika wurde Aqua bidest. verwendet.

Für die Bestückung einer Mikrottestplatte wurden rund 2ml Antimykotikalösung pro Konzentrationsstufe pro Platte benötigt. Je nach Anzahl der zu bestückenden Platten wurde die pro Konzentrationsstufe benötigte Menge an Antimykotikalösung errechnet. Durch entsprechende Verdünnung der Stammlösung, bzw. der Vorverdünnungsreihe mit RPMI-Medium wurde die berechnete Menge hergestellt.

Die Konzentration des Antimykotikums zur Beschickung der Mikrottestplatten war jeweils doppelt so hoch wie die im Test erwünschte Zielkonzentration, auf die sie am Testtag durch die 1:1 zugefügte Menge an Inokulum verdünnt wurde (siehe auch Abschnitt 3.3.3.1).

Um den Ablauf der Mikrodilutionstestung zu beschleunigen und zu ordnen, wurden jeweils größere Mengen an Mikrottestplatten mit der Verdünnungsreihe beschickt und dann bei minimal -27°C in keimarmen Gefrierschränken gelagert. Am Testtag wurden die Platten unter dem Abzug bei Zimmertemperatur über ca. zwei Stunden aufgetaut und mit frisch angesetztem Inokulum beimpft.

3.3.3.1 Herstellung der Fluconazolverdünnungsreihe

Fluconazol lag als Stammlösung mit einer Konzentration von 25600µg/ml vor. Für die erste Konzentrationsstufe (256µg/ml) wurde die Stammlösung 1:100 mit RPMI-Medium verdünnt.

Für die zweite Konzentrationsstufe (128µg/ml) wurde die Stammlösung 1:200 mit RPMI-Medium verdünnt.

Für die dritte Konzentrationsstufe (64µg/ml) wurde in einem extra Ansatz eine kleinere Menge der Stammlösung 1:2 mit Aqua bidest. vorverdünnt. Diese Vorverdünnung wurde dann im Verhältnis 1:200 mit RPMI-Medium gemischt.

Für die vierte Konzentrationsstufe (32µg/ml) wurde in einem extra Ansatz eine kleinere Menge der Stammlösung 1:4 mit Aqua bidest. vorverdünnt. Diese Vorverdünnung wurde dann im Verhältnis 1:200 mit RPMI-Medium gemischt.

Für die fünfte Konzentrationsstufe (16µg/ml) wurde in einem extra Ansatz eine kleinere Menge der Stammlösung 1:8 mit Aqua bidest. vorverdünnt. Diese Vorverdünnung wurde dann im Verhältnis 1:200 mit RPMI-Medium gemischt.

Für die sechste Konzentrationsstufe (8µg/ml) wurde die Vorverdünnung aus dem Ansatz der fünften Konzentrationsstufe (Stammlösung : Aqua bidest. = 1:8) in einem neuen Ansatz 1:2 mit Aqua bidest. vorverdünnt. Diese Vorverdünnung wurde dann im Verhältnis 1:200 mit RPMI-Medium gemischt.

Für die siebte Konzentrationsstufe (4µg/ml) wurde die Vorverdünnung aus dem Ansatz der fünften Konzentrationsstufe (Stammlösung : Aqua bidest. = 1:8) in einem neuen Ansatz 1:4 mit Aqua bidest. vorverdünnt. Diese Vorverdünnung wurde dann im Verhältnis 1:200 mit RPMI-Medium gemischt.

Für die achte Konzentrationsstufe (2µg/ml) wurde die Vorverdünnung aus dem Ansatz der fünften Konzentrationsstufe (Stammlösung : Aqua bidest. = 1:8) in einem neuen Ansatz 1:8 mit Aqua bidest. vorverdünnt. Diese Vorverdünnung wurde dann im Verhältnis 1:200 mit RPMI-Medium gemischt.

Für die neunte Konzentrationsstufe (1µg/ml) wurde die Vorverdünnung aus dem Ansatz der achten Konzentrationsstufe (Stammlösung : Aqua bidest. = 1:64) in einem neuen Ansatz 1:2 mit Aqua bidest. vorverdünnt. Diese Vorverdünnung wurde dann im Verhältnis 1:200 mit RPMI-Medium gemischt.

Für die zehnte Konzentrationsstufe (0,5µg/ml) wurde die Vorverdünnung aus dem Ansatz der achten Konzentrationsstufe (Stammlösung : Aqua bidest. = 1:64) in

einem neuen Ansatz 1:4 mit Aqua bidest. vorverdünnt. Diese Vorverdünnung wurde dann im Verhältnis 1:200 mit RPMI-Medium gemischt.

Die abzulesenden Endkonzentrationen waren nach abschließender 1:2 Verdünnung mit der Hefesuspension 128µg/ml bis 0,25µg/ml.

3.3.3.2 Amphotericin B, Itraconazol, Voriconazol

Die Verdünnungsreihen für diese drei Antimykotika wurden nach dem gleichen Prinzip hergestellt wie die Verdünnungsreihe für Fluconazol (siehe Abschnitt 3.3.3.1). Die folgenden Variationen wurden eingeführt:

- 1) Das Verhältnis von Antimykotikastammlösung bzw. Vorverdünnung zu RPMI-Medium wurde immer halbiert. Also für die erste Konzentrationsstufe eine Verdünnung der Stammlösung mit RPMI-Medium von 1:50, für die zweite und alle folgenden 1:100.
- 2) Die Erstellung der Vorverdünnungsreihen in den Verhältnissen 1:2, 1:4, 1:8 wurde genau so beibehalten, nur dass anstelle des Aqua bidest. wegen der Hydrophobie der Antimykotika entsprechend zur Stammlösung immer DMSO verwendet wurde.

Die abzulesenden Endkonzentrationen lagen nach abschließender 1:2 Verdünnung mit der Hefesuspension im Bereich von 16µg/ml bis 0,0313µg/ml.

3.3.3.3 Caspofungin

Die Mischungsverhältnisse für die Verdünnungsreihe von Caspofungin waren exakt die gleichen wie für die Antimykotika Amphotericin B, Itraconazol und Voriconazol. Für die Herstellung der Vorverdünnungsreihe wurde analog zur Stammlösung Aqua bidest. verwendet. Wie schon in Abschnitt 3.3.2.3 beschrieben, erfolgte auch in diesen Schritten konsequenter Lichtschutz der caspofunginhaltigen Lösungen.

Die abzulesenden Endkonzentrationen lagen nach abschließender 1:2 Verdünnung mit der Hefesuspension im Bereich von 16µg/ml bis 0,0313µg/ml.

3.3.3.4 5-Fluorcytosin

Die Mischungsverhältnisse für die Verdünnungsreihe von 5-Fluorcytosin waren exakt die gleichen wie für Fluconazol. Zur Erstellung der Vorverdünnungsstufen wurde wie für die Stammlösung Aqua bidest. verwendet.

Für 5-Fluorcytosin lagen die abzulesenden Endkonzentrationen im Bereich von 64µg/ml bis 0,125µg/ml.

3.3.4 Beschickung der Mikrotestplatten

Zur Optimierung und besseren Standardisierung der Ableseergebnisse mit dem automatischen Mikrotestplatten-Photometer (siehe Abschnitt 4.1.6) wurden entgegen den CLSI-Leitlinien 96-Loch-Flachboden-Mikrotestplatten an Stelle von Rundboden-Mikrotestplatten eingesetzt. Die Bestückung der Mikrotestplatten erfolgte jedoch entsprechend den Leitlinien des CLSI. Ein *Candida*-Kontrollisolat wurde jeweils parallel auf zwei Reihen der Mikrotestplatte mitgeführt. Pro Platte (acht Reihen) konnten somit vier Isolate getestet werden. In den zwölf Positionen einer Reihe fanden sich als erstes die Wachstumskontrolle, dann die zehn Konzentrationsstufen der Verdünnungsreihe beginnend mit der höchsten Antimykotikakonzentration in Position „Zwei“ absteigend bis zur niedrigsten Antimykotikakonzentration in Position „Elf“ und in Position „Zwölf“ die Sterilkontrolle. Die Mikrotestplatten durchliefen zwei Arbeitsgänge. Im ersten wurden die Testplatten soweit mit RPMI-Medium und den Ansätzen der Verdünnungsreihen der Antimykotika vorbereitet. Im zweiten wurden die Platten mit Inokulum beimpft.

3.3.4.1 Beschickung der Mikrottestplatten mit der Antimykotikaverdünnung

Es wurde unter der sterilen Werkbank mit einer Achtkanalpipette und pro Platte mit einem Satz steriler gelber Pipettenspitzen gearbeitet. Als erstes wurden die Positionen der ersten Spalte (Wachstumskontrolle) mit 100µl und die Positionen der zwölften Spalte (Sterilkontrolle) mit 200µl RPMI-Medium beschickt. Danach wurden die Spalten „Elf“ bis „Zwei“ mit jeweils 100µl der einzelnen Antimykotikaverdünnungsstufen in aufsteigender Konzentration beschickt. Jeweils fünf Platten wurden übereinander gestapelt und zuoberst mit einem sterilen Plastikdeckel abgedeckt. In sterilen Plastiktüten verpackt wurden die Stapel bei -27°C in einem keimarmen Gefrierschrank des Institutes gelagert.

Einen Überblick über die Konzentrationsstufen der einzelnen Antimykotika auf der mit den Antimykotikaverdünnungen vorbestückten Mikrottestplatte gibt Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Die zehn Antimykotikakonzentrationen auf einer 96-Loch-Mikrottestplatte vor Zugabe der Inokula für die sechs getesteten Substanzen. Die Spalten der Wachstumskontrolle und der Sterilkontrolle wurden nur mit Medium beschickt. Alle Konzentrationen sind in µg/ml angegeben.

Spalten													
Reihen		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Amphotericin B	Wachstumskontrolle		32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	Sterilkontrolle
Caspofungin			32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	
Fluconazol			256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
5-Fluorcytosin			128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
Itraconazol			32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	
Voriconazol			32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	

3.3.4.2 Beschickung der Mikrottestplatten mit den *Candida*-Isolaten

Im zweiten Arbeitsgang wurde, je nach Anzahl der zu testenden Stämme, die benötigte Menge der gefrorenen Platten unter der Sterilwerkbank für ca. zwei Stunden bei Zimmertemperatur aufgetaut. Pro Stamm wurden jetzt parallel die Positionen von zwei Reihen bestückt. 100µl des gründlich durchmischten Inokulums wurden mit einer Research-Pipette mit gelber, steriler Spitze zuerst in die Positionen der ersten Spalte und dann aufsteigend in die Positionen der elften bis zweiten Spalte gegeben. Die Positionen der zwölften Spalte blieben für die Sterilkontrolle unbestückt. Nach diesem Schritt befanden sich in jeder Position der Mikrottestplatte 200µl Flüssigkeit. Einen Überblick über die Konzentrationsstufen der einzelnen Antimykotika bei fertig bestückter Mikrottestplatte gibt Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2: Die zehn endgültigen Antimykotikakonzentrationen auf einer 96-Loch-Mikrottestplatte nach Zugabe der Inokula für die sechs getesteten Substanzen. Die Antimykotikakonzentration in den Spalten der Wachstumskontrolle und der Sterilkontrolle ist „Null“. Alle Konzentrationen sind in µg/ml angegeben.

Spalten													
Reihen		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Amphotericin B	Wachstumskontrolle		16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	Sterilkontrolle
Caspofungin			16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	
Fluconazol			128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
5-Fluorcytosin			64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Itraconazol			16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	
Voriconazol			16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	

3.3.5 Inkubation

Die fertig beschickten Mikrottestplatten wurden zu maximal fünf Platten übereinander gestapelt und zuoberst mit einem sterilen Plastikdeckel abgedeckt. Eine sterile, feuchte Kammer wurde mit maximal drei Stapeln bestückt. Die Ansätze wurden so bei 35°C in einem keimarmen, temperaturkontrollierten Brutschrank des Institutes inkubiert. Die Dauer der Inkubation betrug für Stämme der Spezies *C. parapsilosis* 48h, für alle anderen *Candida*-Spezies 24h.

3.3.6 Ablesen der Ergebnisse

Das Ablesen der Mikrottestplatten erfolgte zunächst makroskopisch (siehe auch Abschnitt 4.1.8) zur Kontrolle des regelrechten Wachstums der Hefen und zum Ausschluss von Kontaminationen. Dazu wurden die Platten in ein Metallgestell über einen vergrößernden Ablesespiegel gestellt, so dass die einzelnen Positionen per Auge gut einzusehen waren. Jede Position wurde nun nach den Kategorien „kein sichtbares Wachstum“, „sichtbares, schwaches Wachstum“ und „deutlich sichtbares, starkes Wachstum“ oder „Kontamination“ beurteilt. In einem vorgefertigten Ergebnisbogen mit schematischer Abbildung einer Mikrottestplatte wurden die Ableserresultate für die einzelnen Positionen genau festgehalten. Der Bogen wurde später mit den Ergebnissen der photometrischen Auswertung verglichen, um deren Plausibilität abzuschätzen und sie zu kontrollieren. Die makroskopische Auswertung diente jedoch nicht zur Ermittlung der endgültigen minimalen Hemmkonzentration der einzelnen Stämme.

Hierzu wurde im zweiten Ablesevorgang das Wachstum in den einzelnen Positionen auf der Basis von Trübungsmessungen bei einer Wellenlänge von 630nm im automatischen Mikrottestplatten-Photometer ermittelt. Die Sterilkontrolle in Spalte „Zwölf“ der Mikrottestplatte diente als Nullabgleich.

Um die Genauigkeit der Messung zu gewährleisten (siehe auch Abschnitt 4.1.6), musste jede Position eine möglichst homogene Zellsuspension enthalten. Dies wurde durch mehrmaliges Durchmischen aller Positionen mit einer Achtkanalpipette mit einem Satz steriler gelber Spitzen erreicht. Begonnen wurde mit der Durchmischung in Spalte „Zwei“ und dann entsprechend dem zunehmenden Wachstum bis zur Spalte „Elf“. Zum Schluss wurde die Wachstumskontrolle in Spalte „Eins“ durchgemischt. Nach Kontrolle auf und Beseitigung von störenden Blässchen konnte die Trübung der einzelnen

Positionen bestimmt werden. Danach erfolgte eine Kontrolle der einzelnen Ergebnisse auf ihre Plausibilität im Vergleich mit dem makroskopischen Ableseergebnis. Dann konnte der Mittelwert aus den Trübungswerten der sich entsprechenden Positionen des Doppelansatzes errechnet werden. Durch den Vergleich mit dem Mittelwert der entsprechenden Wachstumskontrolle wurde nun die minimale Hemmkonzentration der Antimykotika für jedes Isolat ermittelt. Dazu wurde bei Amphotericin B die MHK-100 abgelesen, also die Antimykotikakonzentration, bei der kein Wachstum mehr auftrat. Bei Caspofungin und 5-Fluorcytosin wurde die MHK-85 abgelesen. Dies war die Konzentration, die das Wachstum im Vergleich zur Wachstumskontrolle um wenigstens 85% reduzierte und gleichzeitig im Bereich der Konzentrationsstufen lag, in denen sich ein starker Abfall des Wachstums abzeichnete. Für die Azole Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol wurde, wie in der Literatur üblich, die MHK-50 abgelesen. Dies war die Konzentration, die das Wachstum im Vergleich zur Wachstumskontrolle um wenigstens 50% reduzierte und im Bereich der Konzentrationsstufen lag, in denen sich ein starker Abfall des Wachstums abzeichnete.

3.3.7 Beurteilung der Ergebnisse

Nach der minimalen Hemmkonzentration wurden die Stämme hinsichtlich ihrer Sensibilität auf das entsprechende Antimykotikum beurteilt. Dafür wurde mit den von der CLSI für die einzelnen Antimykotika festgelegten oder den in der Literatur gängigen Konzentrationsgrenzen („Breakpoints“) gearbeitet. Anhand der Ergebnisse der Isolate wurden pro Antimykotikum für die einzelnen Spezies bzw. für die Gesamtheit der Isolate MHK_{50} - und MHK_{90} -Werte festgelegt. Dies waren die Antimykotikakonzentrationen kleiner bzw. gleich deren Wert die MHKs von 50% bzw. 90% der entsprechenden Isolate lagen.

3.3.7.1 Fluconazol

Die Stämme wurden nach ihrer minimalen Hemmkonzentration auf der Basis der folgenden festgelegten Konzentrationswerte in drei Gruppen eingeteilt. Als sensibel galten laut CLSI die Isolate, deren MHK_{50} kleiner oder gleich $8\mu\text{g/ml}$ war. Dosisabhängig sensibel waren die Isolate mit einer MHK_{50} zwischen $16\mu\text{g/ml}$ und $32\mu\text{g/ml}$. Mit einer MHK_{50} größer oder gleich $64\mu\text{g/ml}$ wurden die Stämme als resistent eingestuft.

3.3.7.2 Amphotericin B

Die Stämme wurden nach ihrer minimalen Hemmkonzentration auf der Basis des folgenden festgelegten Konzentrationswertes in zwei Gruppen eingeteilt. Als sensibel galten laut CLSI die Isolate, deren MHK_{100} kleiner oder gleich $1\mu\text{g/ml}$ war. Isolate mit einer MHK_{100} größer oder gleich $2\mu\text{g/ml}$ wurden als resistent eingestuft.

3.3.7.3 Itraconazol

Die Stämme wurden nach ihrer minimalen Hemmkonzentration auf der Basis der folgenden festgelegten Konzentrationswerte in drei Gruppen eingeteilt. Als sensibel galten laut CLSI die Isolate, deren MHK_{50} kleiner oder gleich $0,125\mu\text{g/ml}$ war. Stämme mit einer MHK_{50} zwischen $0,25\mu\text{g/ml}$ und $0,5\mu\text{g/ml}$ wurden als intermediär angesehen. Mit einer MHK_{50} größer oder gleich $1\mu\text{g/ml}$ wurden die Stämme als resistent eingestuft.

3.3.7.4 Voriconazol

Die Stämme wurden nach ihrer minimalen Hemmkonzentration anhand von in der Literatur postulierten Konzentrationsgrenzen (Pfaller et al. 2006b) in drei Gruppen eingeteilt. Als sensibel galten Isolate, deren MHK₅₀ kleiner oder gleich 1µg/ml war. Dosisabhängig sensibel waren Isolate mit einer MHK₅₀ von 2µg/ml. Mit einer MHK₅₀ größer oder gleich 4µg/ml wurden die Stämme als resistent eingestuft.

3.3.7.5 Caspofungin

Für Caspofungin existierten bis zur Fertigstellung meiner Arbeit noch keine festgelegten Konzentrationsgrenzen, so dass die getesteten Isolate nicht wie üblich nach ihrer MHK in Gruppen (sensibel, dosisabhängig sensibel, resistent) eingeteilt werden konnten. Angegeben wurden lediglich die MHK₅₀, MHK₉₀ und die Bandbreite der MHKs für die einzelnen Spezies und speziesübergreifend für alle getesteten Isolate.

3.3.7.6 5-Fluorcytosin

Die Stämme wurden nach ihrer minimalen Hemmkonzentration auf der Basis der folgenden festgelegten Konzentrationswerte in drei Gruppen eingeteilt. Als sensibel galten laut CLSI die Isolate, deren MHK₈₅ kleiner oder gleich 4µg/ml war. Dosisabhängig sensibel waren die mit einer MHK₈₅ zwischen 8µg/ml und 16µg/ml. Mit einer MHK₈₅ größer oder gleich 32µg/ml wurden die Stämme als resistent eingestuft.

3.4 Qualitätskontrollen

Zur Qualitätskontrolle, wurden bei jedem Antimykotikum pro Testserie die zwei durch das CLSI empfohlenen Referenzstämme: *C. krusei* ATCC 6258 und *C. parapsilosis* ATCC 22019 mitgetestet. Lagen ihre MHKs in den Testungen nicht in den in der Literatur beschriebenen Referenzbereichen (siehe Tabelle 3.3), so wurde der komplette Ansatz wiederholt.

Außerdem wurde jedes Isolat als Doppelansatz auf zwei Zeilen angesetzt. So konnten beim Ablesen Fehlmessungen erkannt werden. Aus den sich entsprechenden Trübungswerten wurde für jede Konzentrationsstufe eines Isolates ein Mittelwert errechnet. Im Durchschnitt wichen die zwei Trübungswerte nicht mehr als 3% von einander ab. Wenn in seltenen Fällen jedoch Abweichungen von über 5% vorlagen, wurde die Messung wiederholt. Dadurch konnte die Bestimmung der exakten minimalen Hemmkonzentration des einzelnen Isolates erreicht werden.

Als weitere Maßnahme zur Qualitätssicherung wurde während der Testung stichprobenartig die Einsaat mit der in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Methode kontrolliert. So konnte eine gleichmäßige Einsaat nachgewiesen und kontrolliert werden. Durch diese Maßnahmen wurden reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse garantiert.

Tabelle 3.3: Die durch Barry et al. (2000, S. 3459, Table 2) festgelegten Konzentrationsbereiche der MHKs der zwei Referenzstämme *C. krusei* ATCC 6258 und *C. parapsilosis* ATCC 22019. Die Bereiche gelten jeweils für die sechs hier verwendeten Antimykotika bei einer Inkubationszeit von 24 oder 48 Stunden. Alle Angaben in µg/ml.

	<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	
	24h	48h	24h	48h
Amphotericin B	0,5 - 2	1 - 4	0,25 - 2	0,5 - 4
Caspofungin	0,125 - 1	0,25 - 1	0,25 - 1	0,5 - 4
Fluconazol	8 - 64	16 - 128	0,5 - 4	1 - 4
5-Flurcytosin	4 - 16	8 - 32	0,0625 - 0,25	0,125 - 0,5
Itraconazol	0,125 - 1	0,25 - 1	0,125 - 0,5	0,125 - 0,5
Voriconazol	0,0625 - 0,5	0,125 - 1	0,0625 - 0,125	0,0313 - 0,25

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Mikrodilutions-Methode nach CLSI

Zur Etablierung des Mikrodilutionstests in der Arbeitsgruppe wurden die einzelnen wichtigen Parameter des Tests noch einmal auf ihre Wertigkeit hin überprüft.

4.1.1 Einsaat

Die vom CLSI zur Einsaat empfohlene Konzentration für das fertige Inokulum war 5×10^2 bis $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Milliliter bzw. für die Ausgangssuspension in steriler Natriumchloridlösung 1 bis 5×10^6 Zellen pro Milliliter. Um festzulegen, welcher Standard-McFarland-Trübungsmesswert dieser Konzentration entsprach, wurden Proben der Hefesuspensionen nach der Methode in Abschnitt 3.3.1.3 bebrütet und ausgezählt. Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit der Konzentration des Inokulums, bei gleichem Standard-McFarland-Trübungsmesswert, von der jeweils getesteten Spezies. Suspensionen mit Zellen der Spezies *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa*, *C. dubliniensis* und *C. guilliermondii* lagen bei einem Standard-McFarland-Trübungsmesswert von 1,0 im empfohlenen Konzentrationsbereich. Dagegen war bei *Candida glabrata*-Isolaten der Standard-McFarland-Trübungsmesswert für eine entsprechende Einsaat 0,3. Tabelle 4.1 zeigt die Standard-McFarland-Trübungsmesswerte und die gemittelten entsprechenden Konzentrationen für die getesteten *C. glabrata*-Isolate. Dass die Einsaat einen Einfluss auf das Wachstum des Isolates in der Antimykotikalösung hat, wurde in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Auswertung dieses Vortests ergab, dass bei einer Einsaat entsprechend einem Standard-McFarland-Trübungswert von 0,3 die Steigung der Wachstumskurve optimiert werden konnte. Dagegen bewirkten zu niedrige Einsaaten (McFarland-Trübung 0,2) eine Abflachung und damit Verschleierung des Steigungsbeginns der Wachstumskurve um ca. eine Konzentrationsstufe. Zu hohe Einsaaten (McFarland-Trübung 0,5 und 1,0) bewirkten zwar eine gute Abgrenzbarkeit des Steigungsintervalls der Wachstumskurve, jedoch nahm das „trailing growth“ des Isolates bei über der minimalen Hemmkonzentration liegenden Konzentrationsstufen des Antimykotikums zu. Als „trailing growth“ wird ein makroskopisch sichtbares, geringes Wachstum von Hefekolonien bis in hohe Konzentrationen bei fungistatischen Antimykotika bezeichnet (Davey et al. 1998). Das Wachstum der Kolonien erfolgt vor Einsetzen der fungistatischen Wirkung

des Antimykotikums und verschleiert dessen Wirksamkeit, so dass solche Isolate fälschlicherweise als resistent eingestuft werden könnten (siehe Abb. 4.6 Referenzstamm *C. albicans* ATCC 90028 bei der Resistenztestung mit Fluconazol und Abb. 4.7 mit Voriconazol, jeweils in Reihe C und D). Eine höhere Einsaat führt zu einem vermehrten Vorkommen solcher Kolonien und eine längere Inkubationszeit fördert die Ausprägung des punktuellen Wachstums (Abschnitt 4.1.5 mit Abb. 4.4).

Tabelle 4.1: Standard-McFarland-Trübungsmesswerte und daraus resultierende durchschnittliche Zellkonzentrationen für *C. glabrata* in Zellen pro Milliliter [c/ml]. Für die Versuche wurde anhand dieser Werte für die *C. glabrata*-Isolate ein Standard-McFarland-Trübungsmesswert von 0,3 festgelegt.

McFarland	Zellkonzentration
1,0	$\geq 5 \times 10^6$
0,5	$\geq 4 \times 10^6$
0,3	$1 - 3 \times 10^6$
0,2	$\leq 1 \times 10^6$

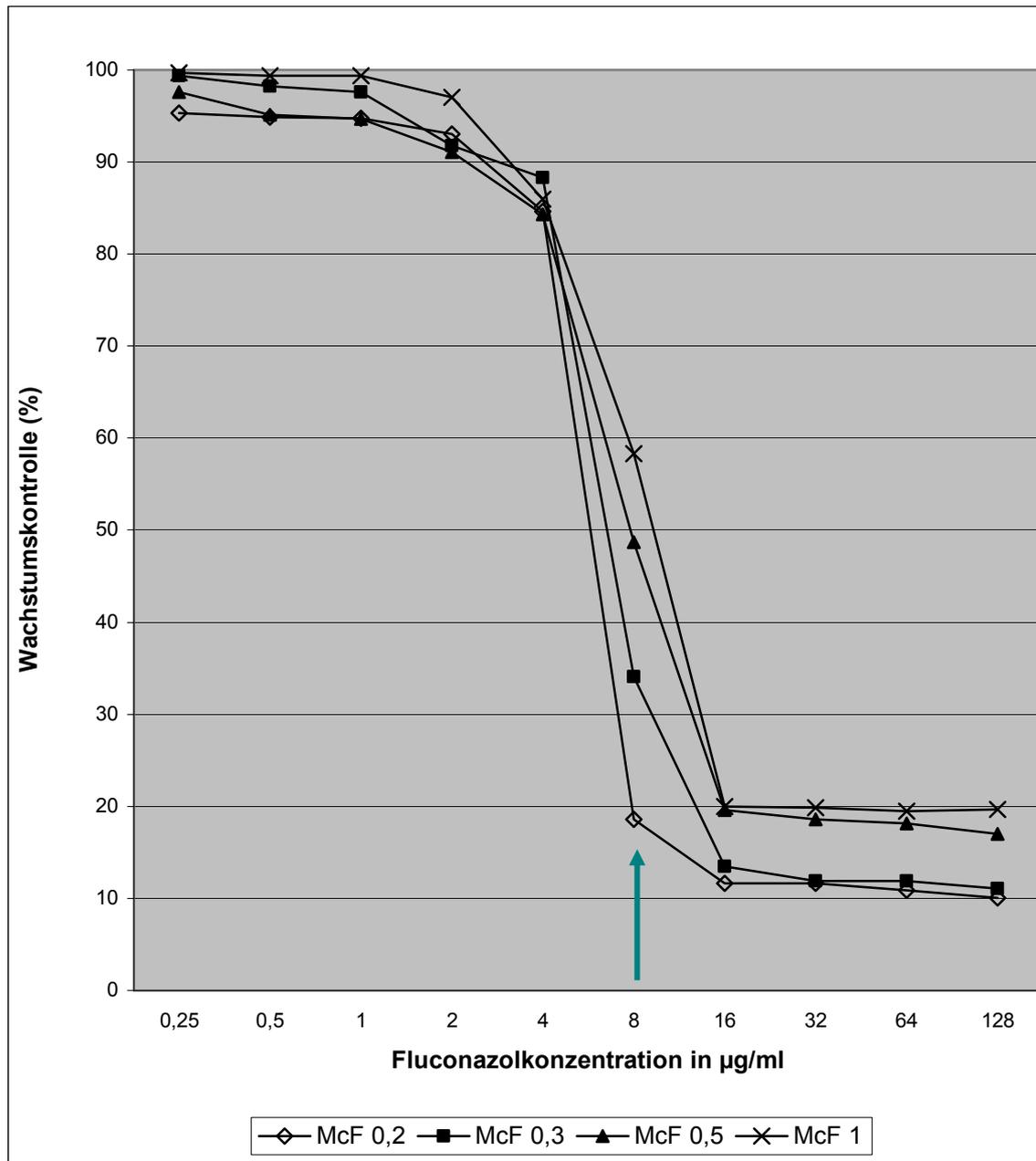


Abbildung 4.1: Beeinflussung des Wachstums durch die Einsaat. Testung von Zellkonzentrationen entsprechend den Standard-McFarland-Trübungsmesswerten von 0,2, 0,3, 0,5, und 1,0 mit dem Referenzstamm *C. glabrata* ATCC 90030 unter den zehn Fluconazolkonzentrationen. Messung bei 630nm nach 24h. Abgelesen wurde die MHK-50. Bei den Ansätzen mit den Einsaaten entsprechend den Standard-McFarland-Trübungsmesswerten von 0,2 und 0,3 kann die MHK-50 eindeutig bei 8µg/dl abgelesen werden. Bei den Ansätzen mit den höheren Einsaaten entsprechend den Standard-McFarland-Trübungsmesswerten von 0,5 und 1,0 würde das Ableseergebnis der MHK-50 fälschlich erhöht bei 16µg/dl liegen.

4.1.2 Lösungsmittel für Antimykotika

Die Antimykotika wurden bis auf eine Ausnahme entsprechend den CLSI-Leitlinien mit den vorgegebenen Lösungsmitteln angesetzt (siehe auch 3.3.2). Die Fluconazol-Reinsubstanz wurde entgegen den CLSI-Leitlinien in Methanol gelöst (Schmalreck und Fegeler 1996) und dann wie in den Abschnitten 3.3.2.1 und 3.3.3.1 beschrieben entsprechend den CLSI-Leitlinien im Medium verdünnt. Versuche, die Substanz bei Raumtemperatur in Aqua bidest. zu lösen, waren gescheitert. Das Erhitzen der Suspension auf 70°C führte zur Lösung des Antimykotikums. Da jedoch die Hitzeeinwirkung unter Umständen zu nicht kontrollierbaren Wirkeinschränkungen des Fluconazols geführt hätte, wurde von dieser Möglichkeit zur Lösung abgesehen. In Methanol konnte Fluconazol problemlos gelöst werden. Mit allen gelösten Antimykotika wurden Vortestungen durchgeführt, um zu gewährleisten, dass reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Mikrodilutionstests mit den vier ATCC-Referenzstämmen *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 750 und *C. albicans* ATCC 90028 lieferten minimale Hemmkonzentrationen, die in den von der CLSI festgelegten Referenzbereichen der Teststämme für das jeweilige Antimykotikum lagen.

4.1.3 Glucosekonzentration des RPMI-Mediums

In den CLSI-Leitlinien wurde für den Mikrodilutionstest RPMI-Medium mit einer Glucosekonzentration von 0,2% und eine Inkubationszeit von 24 bis 48 Stunden empfohlen. In der Literatur (Bartizal und Odds 2003, Cuenca-Estrella et al. 2001, Davey et al. 1998, Rex et al. 2001) und nach den Vorgaben von EUCAST (Cuenca Estrella et al. 2003, Espinel-Ingroff et al. 2005) konnte der Test mit bis zu 10fach höheren Glucosekonzentrationen im Medium durchgeführt werden, um eine Reduktion der Inkubationszeit auf 24 Stunden zu erreichen. Um die optimale Glucosekonzentration für die Etablierung und Vereinfachung des Tests festzulegen, wurden die vier ATCC-Referenzstämme *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 750 und *C. albicans* ATCC 90028 in Versuchsansätzen mit Glucosekonzentrationen von 0,2%, 0,4% und 2% für alle sechs Antimykotika getestet. Das Ergebnis nach 24-stündiger Inkubationszeit war eindeutig. Das Wachstum und damit die Ergebnisse der Trübungsmessung in den 0,2%igen Ansätzen entsprachen für alle Antimykotika den Ergebnissen der Ansätze mit 0,4% und 2% Glucose. Abbildung 4.2 zeigt beispielhaft das unveränderte, prozentuale Wachstumsverhalten des Referenzstammes *C. krusei* ATCC 6258 auf die Resistenztestung mit Voriconazol unter den verschiedenen Glucosekonzentrationen. Durch die höheren Glucosekonzentrationen waren die minimalen Hemmkonzentrationen der Antimykotika für den jeweiligen Referenzstamm schon nach 24 Stunden ablesbar, da schon nach dieser verkürzten Zeit aussagekräftige Trübungswerte gemessen werden konnten. Tabelle 4.2 verdeutlicht den Anstieg der Trübungsmesswerte der Wachstumskontrollen unter erhöhten Glucosekonzentrationen von 0,4% und 2% nach 24-stündiger Inkubationszeit im Gegensatz zu der 0,2%igen Glucosekonzentration. Da eine Glucosekonzentration von 2% in Hinblick auf die Wachstumsbeschleunigung keinen Vorteil gegenüber einer Glucosekonzentration von 0,4% erbrachte, wurde beschlossen, die Tests möglichst nah an den CLSI-Richtlinien mit einer Glucosekonzentration von 0,4% im Medium durchzuführen.

Tabelle 4.2: Trübungsmesswerte (OD) der Wachstumskontrolle (entsprechend einem 100%igen Wachstum) nach 24-stündiger Inkubationszeit in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Medium am Beispiel von *C. krusei* ATCC 6258. Die Trübungsmesswerte der Wachstumskontrolle bei einer Glucosekonzentration von 0,4% und 2,0% liegen im gewünschten OD-Bereich zwischen 0,500 und 0,800 und weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Dagegen ist der Trübungsmesswert bei einer Glucosekonzentration von 0,2% deutlich erniedrigt.

Glucosekonzentration in %	Trübungsmesswerte (OD) nach 24h
0,2	0,182
0,4	0,522
2,0	0,525

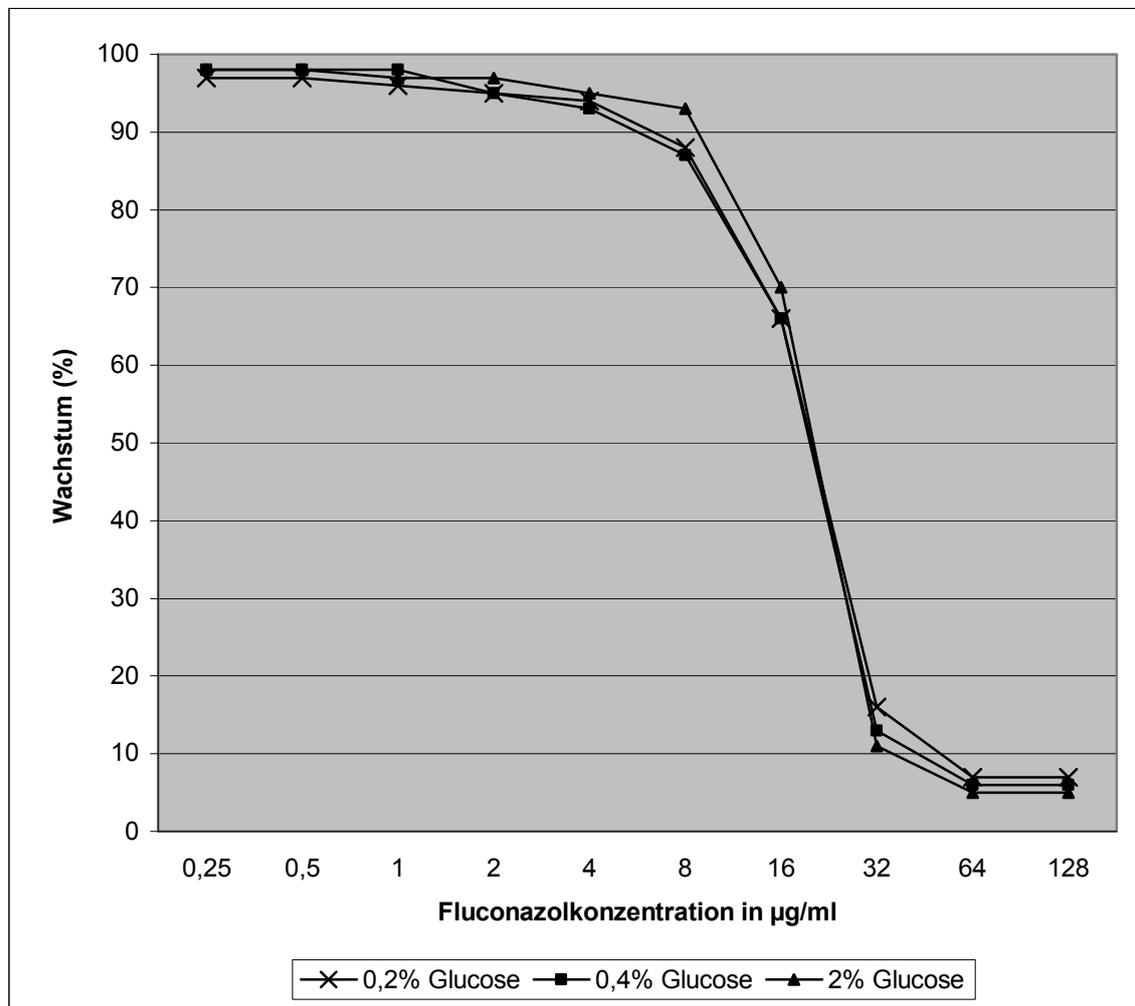


Abbildung 4.2: Trübungsmesswerte in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration des Mediums am Beispiel von *C. krusei* ATCC 6258 unter Fluconazol. Messung nach 24-stündiger Inkubationszeit bei 630nm. Deutlich wird, dass eine Erhöhung der Glucosekonzentration keinen Einfluss auf die Ablesegenauigkeit hat. Die MHK-50 liegt in allen drei Ansätzen bei 32µg/ml.

4.1.4 Mikrottestplatten

Für den Mikrodilutionstest wurden, wie in den EUCAST-Leitlinien festgelegt, 96-Loch-Flachboden-Mikrottestplatten und nicht, wie in den CLSI-Leitlinien empfohlen, 96-Loch-Rundboden-Mikrottestplatten verwendet. Vorversuche mit Rundboden- und Flachboden-Mikrottestplatten zeigten, dass es keine Unterschiede in der Ablesegenauigkeit der Trübungsmesswerte mit dem automatischen Mikrottestplatten-Photometer gab (siehe Abbildung 4.3). Die Flachbodenplatten ließen sich in der makroskopischen Beurteilung (siehe auch Abschnitt 3.3.6) mit dem Vergrößerungsspiegel besser auswerten. Durch den konkaven Boden der Rundbodenplatten und die damit verbundenen Lichtreflexe und Brechungsartefakte in der Flüssigkeit konnten Verunreinigungen und minimales Wachstum der Hefezellen hier im Gegensatz zu den Flachbodenplatten nicht hinreichend erkannt werden. Da die makroskopische Beurteilung der Platten die wichtigste Qualitätskontrolle beim automatischen Ablesen der Mikrottestplatten mit dem Photometer darstellte, wurden die Mikrodilutionstests mit Flachbodenplatten durchgeführt.

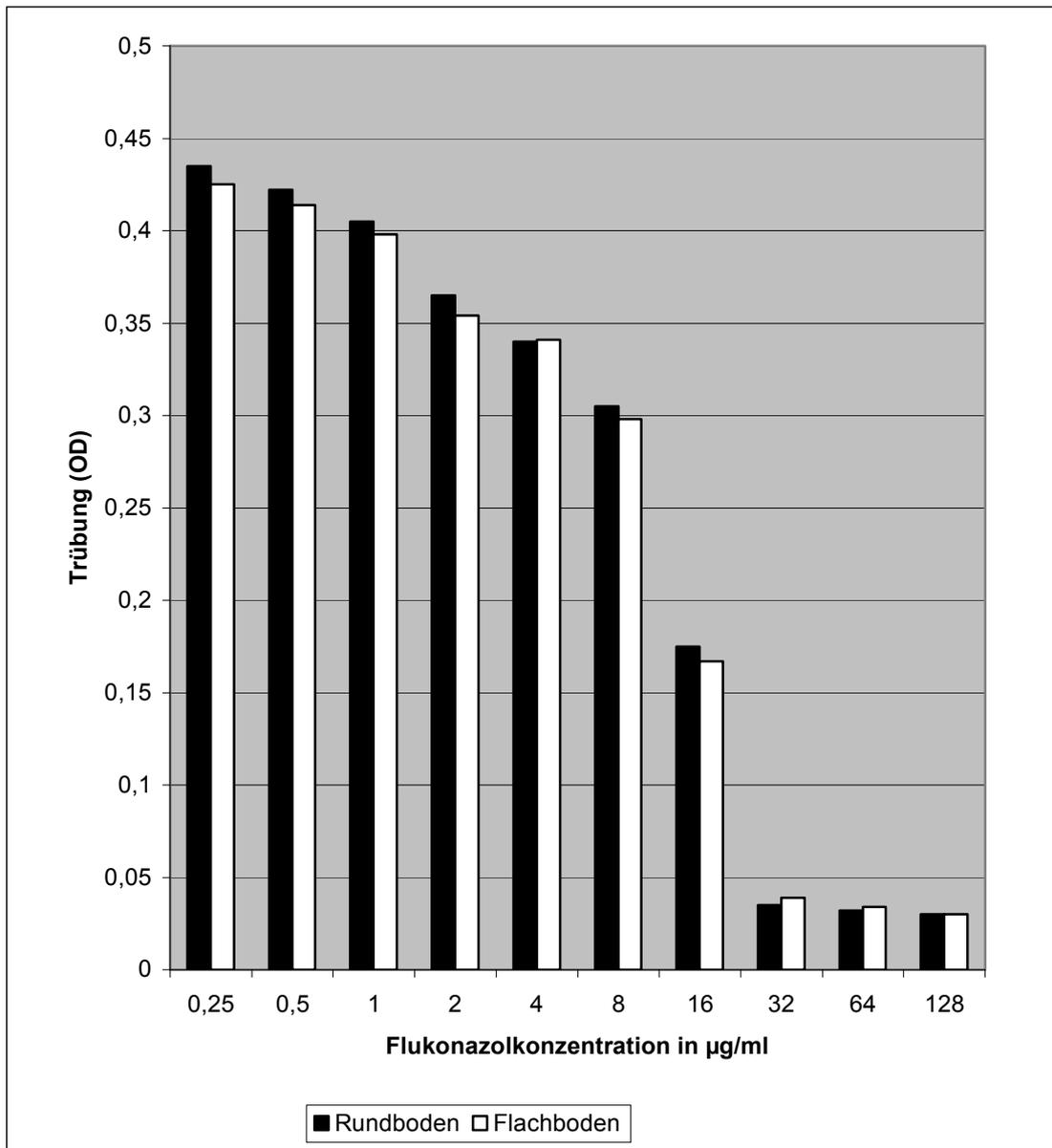


Abbildung 4.3: Trübungsmesswerte in Abhängigkeit von der Verwendung einer Rund- oder einer Flachboden-Mikrotestplatte. Parallelansatz mit Referenzstamm *C. krusei* ATCC 6258 unter Fluconazol. Messung nach 24-stündiger Inkubation bei 630nm. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bei der Messung der Trübungswerte in einer Rund- oder einer Flachbodenplatte.

4.1.5 Inkubationszeit

Die Leitlinien des CLSI gaben eine Inkubationszeit von 24 bis 48 Stunden je nach Wachstumseigenschaften der Stämme vor. In den Vortestungen zur Etablierung des Mikrodilutionstests wurde deutlich, dass eine lange Inkubationszeit von 48 Stunden vor allem bei der Testung gegen die Azole zu einer deutlich höheren Fehlerrate beim photometrischen Ablesen der Mikrotestplatten führte. Diese Ablesefehler wurden nur zu einem geringen Teil durch Kontaminationen hervorgerufen und beruhten überwiegend auf einem Durchwachsen der eigentlich sensiblen Stämme bis in hohe Antimykotikakonzentrationen, in der Literatur (Davey et al. 1998) als „trailing growth“ (auch Abschnitt 4.1.1) beschrieben. Siehe dazu Abbildung 4.4. Da alle getesteten Spezies bis auf *C. parapsilosis* nach 24-stündiger Inkubation bei 35°C ein ausreichendes Wachstum und gute Trübungsmesswerte aufwiesen, wurde die Inkubationszeit auf 24 Stunden bei 35°C festgelegt.

Alle Isolate der Spezies *C. parapsilosis* zeigten ein deutlich langsames Wachstum und wurden samt dem Referenzstamm *C. parapsilosis* ATCC 22019 erst nach 48 Stunden Inkubationszeit abgelesen. Siehe dazu Abbildung 4.5.

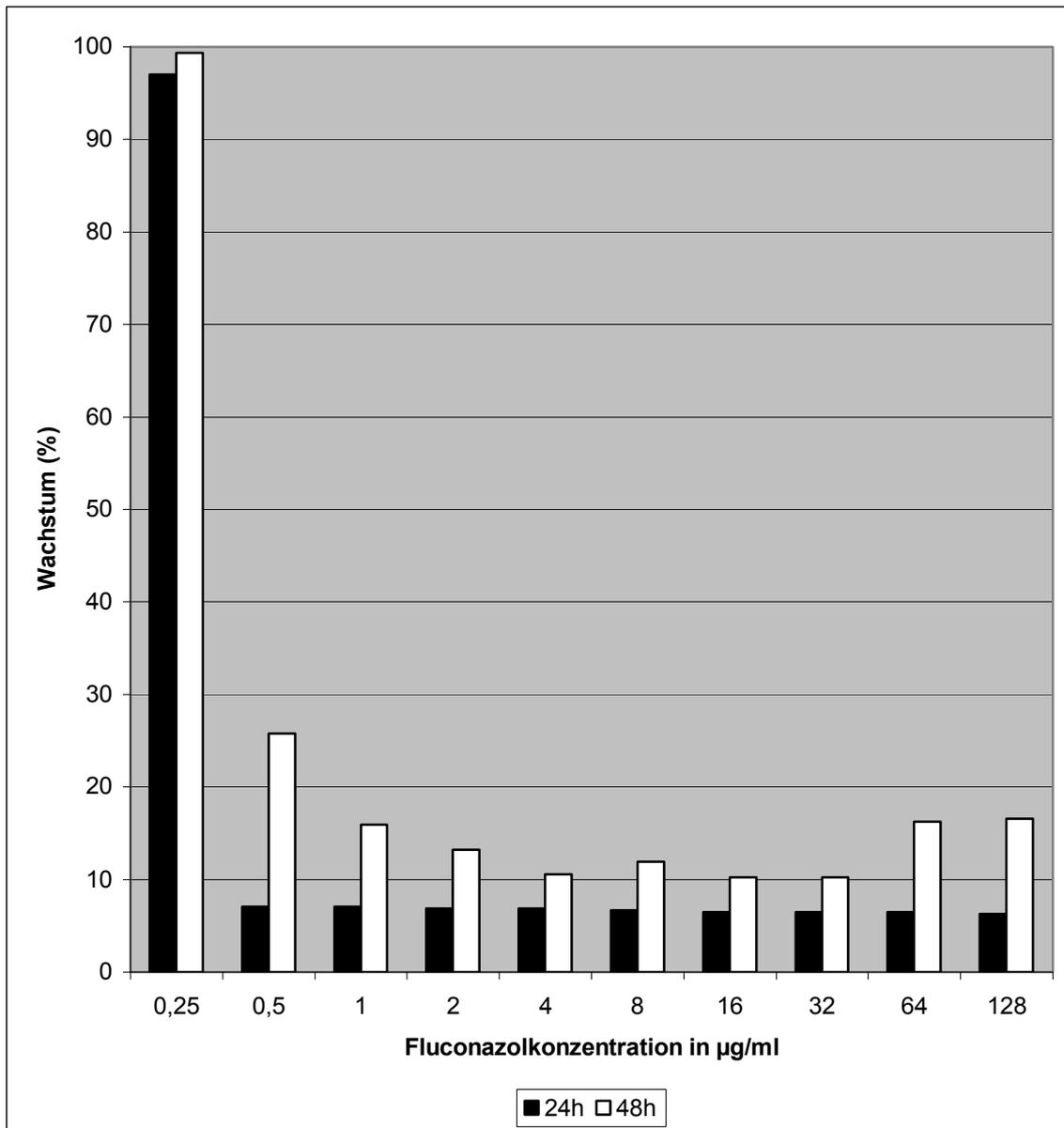


Abbildung 4.4: Trübungsmesswerte von *C. albicans* in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Parallelansatz mit *C. albicans* Nr.150 unter Fluconazol. Messung bei 630nm nach 24-stündiger und nach 48-stündiger Inkubationszeit. Deutliche Darstellung der Zunahme des „trailing growth“ nach längerer Inkubationszeit.

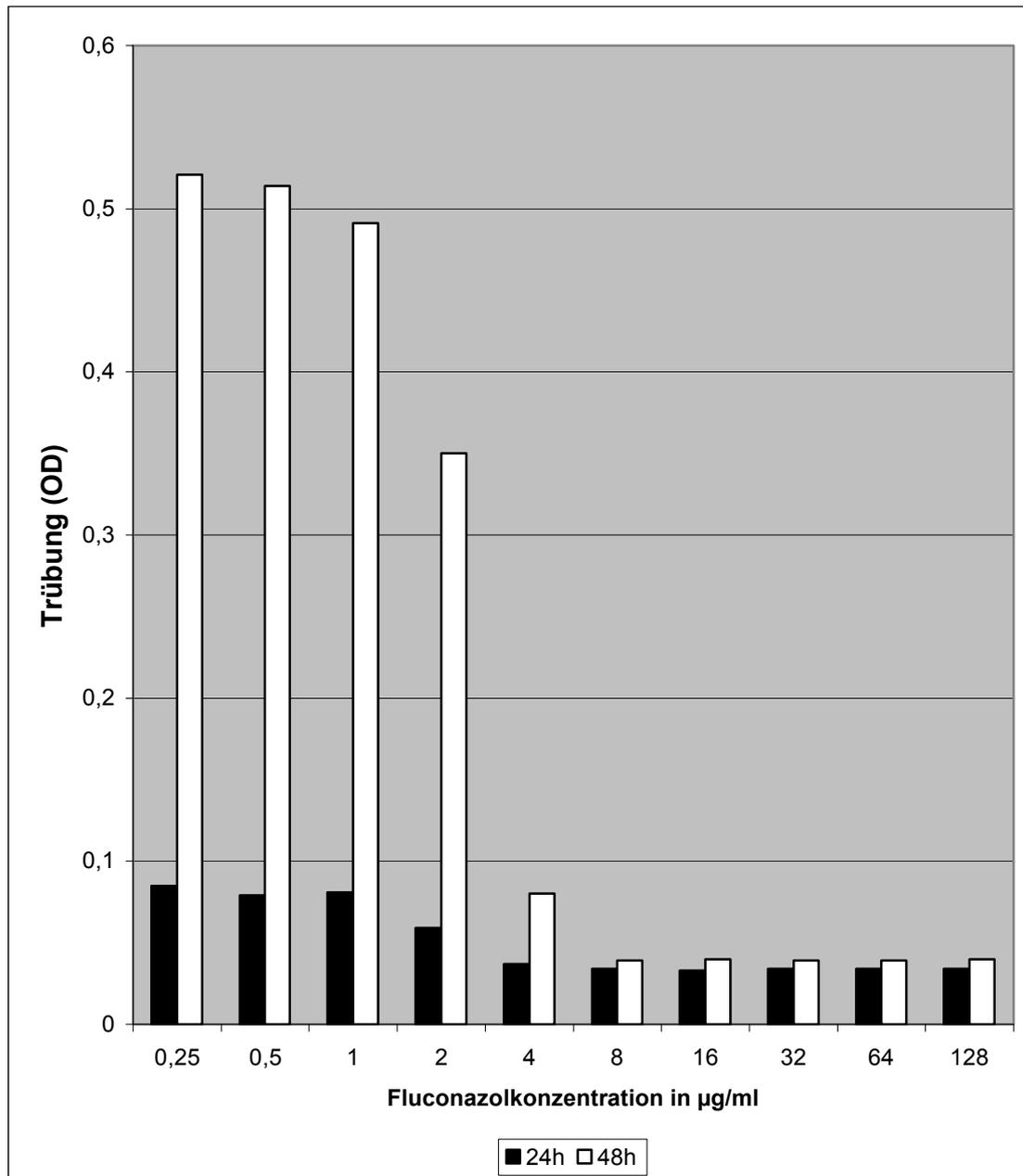


Abbildung 4.5: Trübungsmesswerte von *C. parapsilosis* in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Parallelansatz mit dem Referenzstamm *C. parapsilosis* ATCC 22019. Messung bei 630nm nach 24-stündiger und nach 48-stündiger Inkubationszeit. Darstellung des unzureichenden Wachstums nach 24-stündiger Inkubation. Im Vergleich dazu gutes Wachstum nach 48-stündiger Inkubation mit klarer Ablesbarkeit der MHK-50 bei 4µg/dl.

4.1.6 Vorbereitung der Platten zur photometrischen Messung

Die Reproduzierbarkeit der photometrisch gemessenen Trübungswerte wurde, wie schon in der Literatur beschrieben, durch inhomogenes, punktuell Wachstum der Isolate und durch Luftbläschen in den Positionen der Mikrotiterplatten (Espinel-Ingroff et al. 2005) stark beeinflusst. Eine homogene Suspension der Hefezellen in den Positionen konnte erreicht werden, indem diese vor dem photometrischen Ablesen mit einer Multipipette, wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben, gut durchmischt wurden. Dadurch konnten auch die störenden Lufteinschlüsse beseitigt werden. Die optische Dichte der so behandelten Ansätze war auch bei wiederholten Messungen nachvollziehbar. Auch die Messwerte der pro Isolat doppelt angesetzten Messreihe zeigten mit dieser Methode geringere Abweichungen voneinander (unter 3% durchschnittliche Abweichung gegenüber fast 30% durchschnittliche Abweichung bei den nicht durchmischten Doppelansätzen).

4.1.7 Ergebnisinterpretation

Das makroskopische Ablesen der Mikrotiterplatten diente allein der Qualitätssicherung. So konnten vor dem Durchmischen zur photometrischen Ablesung kontaminierte Positionen markiert werden, um eine unbemerkte Verfälschung der Messergebnisse zu verhindern. Quantitative Aussagen, das Wachstum der Hefeisolate betreffend, wurden auf Basis der makroskopischen Ablesung nicht getroffen, da die photometrische Methode weitaus genauere und untersucherunabhängige Daten lieferte.

Die Auswertung der photometrischen Daten erfolgte quantitativ anhand der photometrisch gemessenen Trübung. Die Wachstumskontrolle in Spalte „Eins“ der Mikrotiterplatten lieferte dabei den Trübungswert, der ein ungehemmtes Wachstum des jeweiligen Isolates darstellte; der also im Vergleich zu den Trübungswerten der Spalten „Zwei“ bis „Elf“ einem 100%igen Wachstum entsprach. Die Hemmung des Wachstums durch das jeweilige Antimykotikum wurde dann in Abhängigkeit vom Wert der Wachstumskontrolle in % angegeben. Für vier Antimykotika gab es von der CLSI festgelegte Wachstumsgrenzen (Fluconazol, Itraconazol, Amphotericin B, 5-Fluorcytosin). Für Voriconazol existierten in der Literatur postulierte Beurteilungsgrenzen (Pfaller et al. 2006b).

Während für Caspofungin bis zur Fertigstellung meiner Arbeit keine Wachstumsgrenzen festgelegt waren.

Für die fungistatischen Azole Fluconazol (Abbildung 4.6), Itraconazol und Voriconazol (Abbildung 4.7) wurde die Ablesegrenze aufgrund des auch bei einer Inkubationszeit von nur 24 Stunden vorhandenen „trailing growth“ von der Steigung der Wachstumskurve abhängig gemacht und lag somit bei einer MHK-50. Dies ermöglichte bei azolsensiblen Isolaten, die makroskopisch und photometrisch bei niedrigen Trübungswerten durchgewachsen waren, eine genaue Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration. Azolresistente Stämme konnten klar abgegrenzt werden, da hier die Trübungswerte bis in Positionen mit höheren Azolkonzentrationen im Vergleich zur Wachstumskontrolle kaum abnahmen. Isolate, deren erste Messergebnisse keine eindeutige Festlegung der Empfindlichkeitsgrenze zuließen, wurden erneut getestet und konnten dann zumeist ohne Probleme ausgewertet werden. Für Caspofungin und 5-Fluorcytosin konnte sehr genau bei einer MHK-85 abgelesen werden, da es sich um fungizide Antimykotika handelt. Die Wachstumskurven aller getesteten Isolate zeigten steile Anstiege ohne „trailing growth“ und waren daher eindeutig auszuwerten. Nachtestungen mussten nur selten aufgrund von Kontaminationen vorgenommen werden. Auch bei Amphotericin B zeigten die Wachstumskurven der Isolate sehr definierte, steile Gefälle (Abbildung 4.8) innerhalb einer Konzentrationsstufe bis auf Sterilkontrollenniveau. „Trailing growth“ wie bei den Azolen trat nicht auf. Das Ablesen der Isolate erfolgte daher bei einer MHK-95.

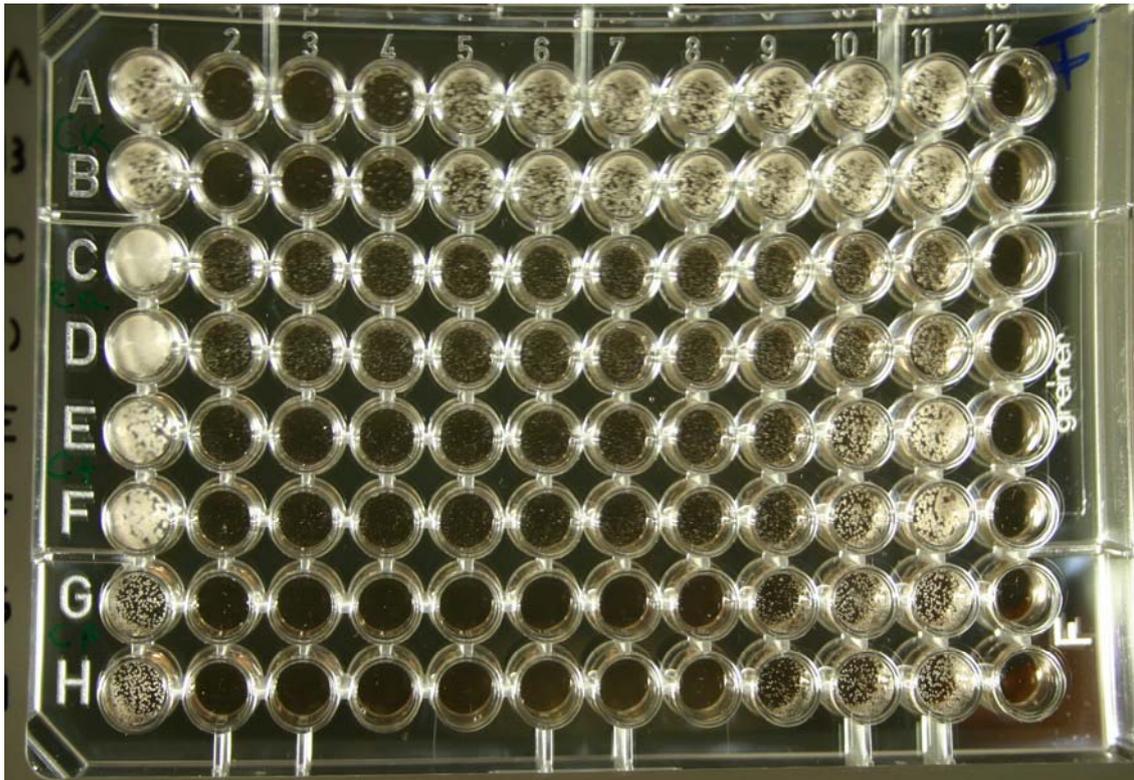


Abbildung 4.6: Fluconazol

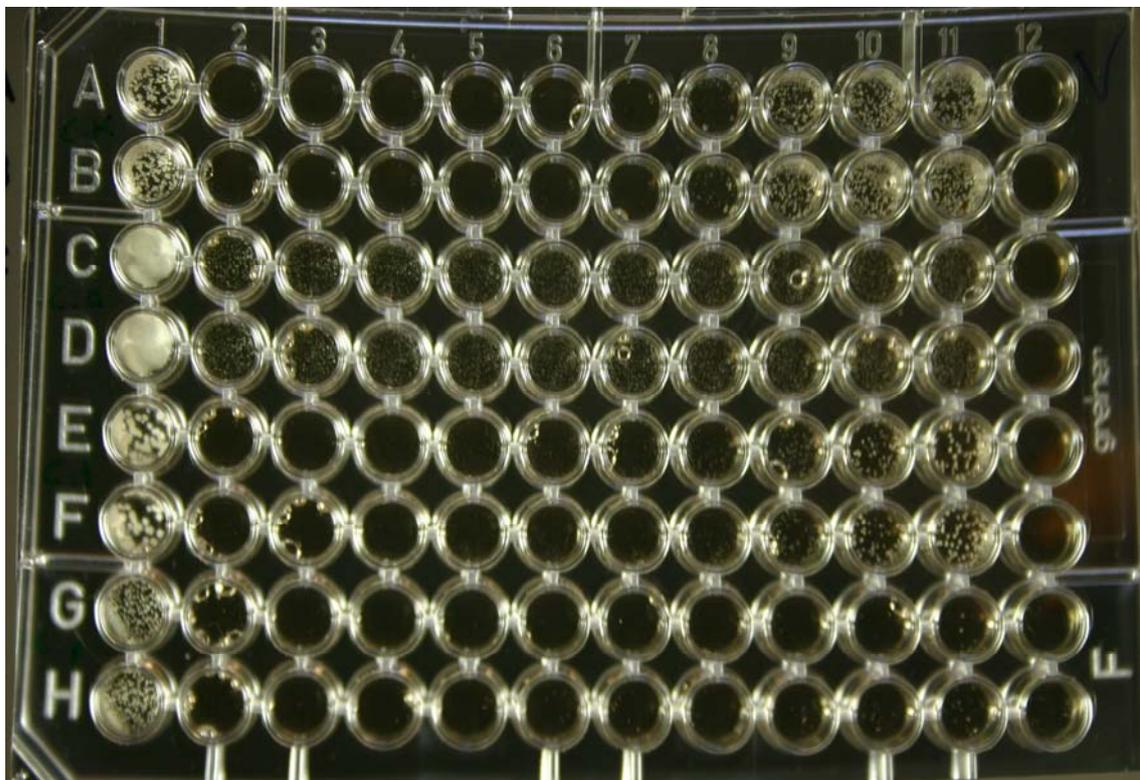


Abbildung 4.7: Voriconazol

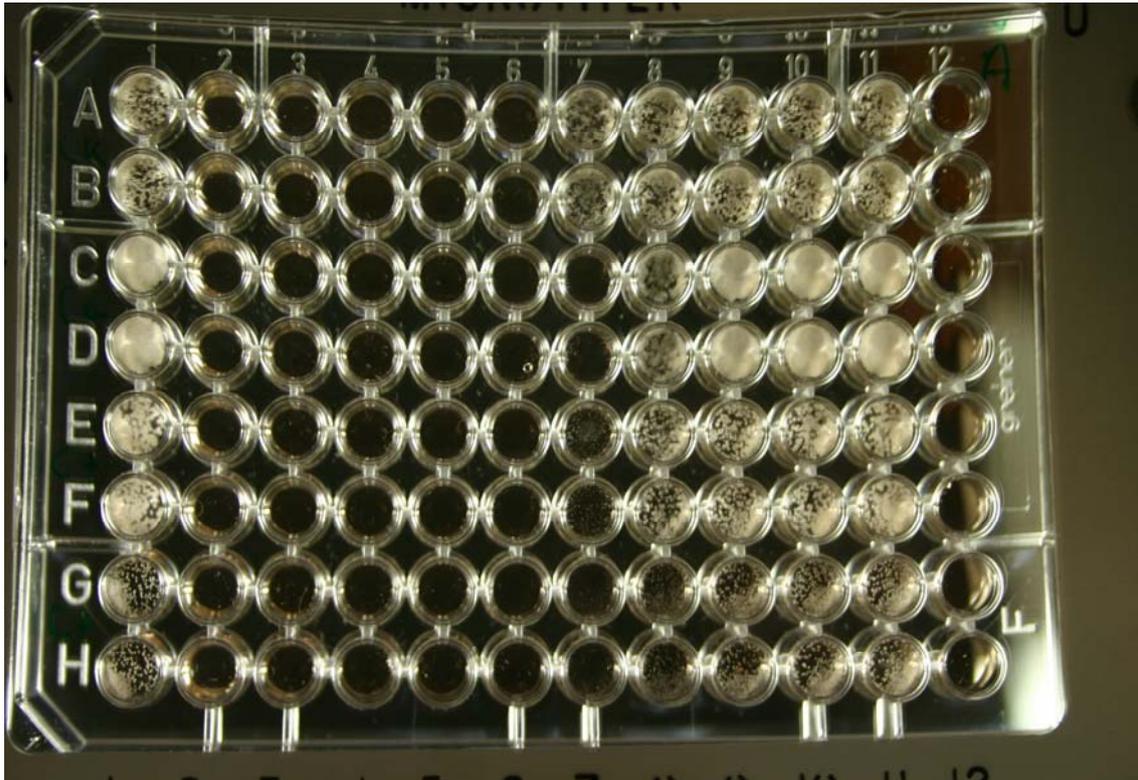


Abbildung 4.8: Amphotericin B

Abbildungen 4.6 bis 4.8: Testung der Referenzstämmen *C. krusei* ATCC 6258 jeweils in Reihe A und B, *C. albicans* ATCC 90028 jeweils in Reihe C und D, *C. tropicalis* ATCC 750 jeweils in Reihe E und F und *C. parapsilosis* ATCC 22019 jeweils in Reihe G und H. Die Wachstumskontrolle befand sich immer in Spalte „Eins“ und die Sterilkontrolle in Spalte „Zwölf“. Die Antimykotikakonzentrationen sind von Spalte „Elf“ nach „Zwei“ ansteigend. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Deutliche Darstellung des „trailing growth“ vor allem bei *C. albicans* ATCC 90028 unter Fluconazol und Voriconazol im Vergleich zum sehr definierten Wachstum unter Amphotericin B.

Außerdem in allen drei Ansätzen Sichtbarkeit des nach 24-stündiger Inkubation noch verminderten Wachstums von *C. parapsilosis* ATCC 22019 gegenüber dem Wachstum der anderen Teststämmen.

4.2 Statistische Auswertung der Fragebögen

Die 227 *Candida*-Isolate wurden samt ihrer Daten zur besseren Vergleichbarkeit und nationalen Aussagekraft in 149 deutsche und 78 österreichische Stämme unterteilt. Die zu den Isolaten per Fragebogen erhobenen Informationen wurden retrospektiv ausgewertet. Die statistische Auswertung der Daten von seltenen *Candida*-Spezies war aufgrund der kleinen Fallzahlen zumeist nicht sinnvoll.

4.2.1 Altersverteilung

Aus den Patientendaten der 227 Isolate ließ sich ein mittleres Patientenalter von rund 53 Jahren errechnen. Gravierende Unterschiede in der Altersverteilung zwischen deutschen und österreichischen Patienten gab es nicht, wobei die österreichischen Patienten im Schnitt etwas jünger waren. Das Durchschnittsalter der deutschen Patienten lag bei 55, das der österreichischen bei 49 Jahren. Das Geschlecht spielte in Bezug auf das Durchschnittsalter eine Rolle. Die erkrankten deutschen Männer waren im Schnitt 54, die österreichischen 49 Jahre alt. Bei den erkrankten Frauen war die Differenz markanter. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei den deutschen Frauen mit 56 Jahren noch zwei Jahre über dem der deutschen Männer und sogar acht Jahre über dem der österreichischen Frauen mit 48 Jahren (Tabelle 4.3).

Das Geschlecht der Patienten in Bezug auf die Speziesverteilung spielte vor allem bei der Erkrankung mit seltenen *Candida*-Spezies eine Rolle. So wurden fünf der sechs seltenen Spezies aus dem Blut von Frauen isoliert, nur eines der zwei deutschen *C. lusitaniae*-Isolate stammte von einem Mann.

Insgesamt war das Verhältnis zwischen Patientinnen und Patienten 1:1,6 (D) bzw. 1:1,2 (A), was auch der Geschlechterverteilung bei Infektionen mit *C. albicans* entsprach. Noch deutlicher wurde der Unterschied in der Geschlechterverteilung bei *C. tropicalis* und *C. parapsilosis*. Hier lag das Verhältnis zwischen erkrankten deutschen Frauen und erkrankten deutschen Männern bei 1:3,3 bzw. 1:2,3. Bei zwölf der 149 deutschen Isolate fehlte die Angabe zum Geschlecht des Patienten. Die Daten dieser Isolate konnten in der Geschlechterverteilung nicht berücksichtigt werden, wurden aber in alle geschlechtsunabhängigen Auswertungen mit einbezogen. Die genaue Analyse dieser Daten ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3: Speziesverteilung der deutschen (D) und österreichischen (A) Isolate in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht (männlich = **M**, weiblich = **W**) der Patienten. Außerdem Angabe des jeweiligen Durchschnittsalters (**Ø-Alter**) für die geschlechtsspezifischen Gruppen.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. parapsilosis</i>		andere		gesamt		
	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	gesamt
M													
≤ 1	4	4						1			4	5	9
2 bis 15	1	1					2				3	1	4
16 bis 64	29	17	5	3	8	2	5	2	1		49	24	73
≥ 65	18	10	6	1	5			1			29	12	41
Alle	52	32	11	4	13	2		4			85	42	127
Ø-Alter	53	48,4	61	55	63	58,5	57	44,5			54	49,1	52,4
W													
≤ 1		4						1	1		1	5	6
2 bis 15	1	2									1	2	3
16 bis 64	20	15	6	2	3	1	2		2		33	19	52
≥ 65	11	6	4	2	1	2	1		1	1	18	10	28
Alle	32	27	10	4	4	3					53	36	89
Ø-Alter	59	43,7	59	67,3	44	73,7	38				56	47,9	52,7
Alle													
≤ 1	4	8						2	1		5	10	15
2 bis 15	2	3					2				4	3	7
16 bis 64	56	32	11	5	11	3	8	2	3	1	89	43	132
≥ 65	31	16	12	3	6	2	1	1	1		51	22	73
Alle	93	59	23	8	17	5	11	5	5	1	149	78	227
Ø-Alter	54,8	46,1	61,8	61,1	59	67,6	44,1	35,7			55	48,6	52,8

4.2.2 Risikofaktoren

Der wichtigste Risikofaktor im Vorfeld einer Candidämie war mit 80,2% ein intravasaler Zugang (zentral venöse und arterielle Katheter). Von den deutschen Patienten hatten 71,1%, von den österreichischen sogar 96,2% einen intravasalen Zugang, als die Candidämie diagnostiziert wurde. Diese höhere Rate an intravasalen Kathetern bei den österreichischen Patienten war bei Candidämien mit allen Spezies zu beobachten. Wobei in beiden Ländern die Infektionen mit *C. parapsilosis* mit den höchsten Raten an Kathetern einhergingen. (D: 81,8%; A: 100%). Die niedrigste Katheterrate hatten die deutschen Patienten mit *C. tropicalis*-Candidämie (58,8%) gefolgt von denen mit *C. glabrata*-Candidämie (65,2%). In diesem Punkt unterschieden sich die österreichischen Daten deutlich. Hier lag die niedrigste Katheterrate bei den *C. glabrata*-Candidämien mit 87,5% noch deutlich über der durchschnittlichen deutschen Katheterrate. Die *C. tropicalis*-Candidämien gingen sogar zu 100% mit einer Katheterisierung der Patienten einher. Die Patienten mit einer *C. albicans*-Candidämie waren in beiden Ländern zu einem vergleichsweise hohen Anteil katheterisiert (D: 76,3%; A: 96,6%), wobei auch hier die Rate der österreichischen Patienten weit über der der deutschen Patienten lag (Tabelle 4.4.).

Der zweitwichtigste Risikofaktor mit 76,7% (71,1% bei den deutschen und 87,2% bei den österreichischen Patienten) war die Behandlung mit mindestens einem Antibiotikum. Wobei auch bei diesem Risikofaktor die österreichischen Daten höhere Raten ergaben als die deutschen. Bei den deutschen Patienten mit *C. glabrata*-Candidämie waren 91,3% vorher antibiotisch behandelt worden, dann folgten Patienten mit *C. parapsilosis*- und *C. albicans*-Candidämien mit 72,7% bzw. 68,8% Antibiotikatherapie. Die niedrigste Rate an Antibiotikavorbehandlung (58,8%) fand sich bei den *C. tropicalis*-Candidämien. Die Daten der österreichischen Patienten zeigten in diesem Punkt keine Übereinstimmung. Hier gab es bei den *C. tropicalis*-Candidämien die höchste Antibiosenrate (100%) gefolgt von den *C. albicans*-Candidämien mit 91,5 %. Die niedrigsten Raten an vorhergegangener Antibiose zeigten *C. glabrata*- und *C. parapsilosis*-Candidämien mit 75% bzw. 60%.

Etwa die Hälfte aller Isolate, 52,9% (47,0% der deutschen und 64,1% der österreichischen Isolate), stammte von intensivmedizinisch betreuten Patienten.

47,6% aller Isolate (43% der deutschen und 56,4% der österreichischen Isolate) wurde von Patienten nach chirurgischer Intervention isoliert.

Onkologische Risikofaktoren waren solide Tumoren bei 19,4% aller Patienten (24,2% der deutschen und 10,3% der österreichischen Patienten) und hämatoonkologische Leiden bei 5,3% aller Patienten (4,7% der deutschen und 6,4% der österreichischen Patienten).

Neben den Antibiosen war die Behandlung mit Steroiden bei 17,2% aller Patienten (16,1% der deutschen und 19,2% der österreichischen Patienten) ein wichtiger pharmakologischer Risikofaktor. 7,5% aller Patienten (5,4% der deutschen und 11,5% der österreichischen Patienten) erhielten zum Diagnosezeitpunkt der Candidämie eine Chemotherapie.

Seltenere Risikofaktoren waren Organtransplantationen, HIV-Infektionen und Frühgeburtlichkeit (4,8%, 1,3% und 5,3%). Einen Überblick über diese Daten zeigt Tabelle 4.4.

Tabelle 4.4: Die wichtigsten Risikofaktoren im Vorfeld der Candidämie in Bezug auf die Anzahl (%) der Stämme insgesamt und auf die Anzahl (%) der jeweiligen Spezies. Unterteilung der Tabelle in deutsche (D) und österreichische (A) Daten. Die Anlage eines intravasalen Katheters und eine Antibiotikatherapie waren dabei mit Abstand die am häufigsten im Vorfeld der Candidämie zu findenden Risikofaktoren.

		insgesamt	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	andere
intravasaler Zugang	D	107(71,8%)	71 (76,3%)	15 (65,2%)	10 (58,8%)	9 (81,8%)	3 (60%)
	A	75 (96,2%)	57 (96,6%)	7 (87,5%)	5 (100%)	5 (100%)	1(100%)
Antibiotika Therapie	D	106(71,1%)	64 (68,8%)	21 (91,3%)	10 (58,8%)	8 (72,7%)	3 (60%)
	A	68 (87,2%)	54 (91,5%)	6 (75,0%)	5 (100%)	3 (60%)	
Intensivstation	D	70 (47,0%)	45 (48,4%)	12 (52,2%)	9 (52,9%)	4 (36,4%)	
	A	50 (64,1%)	42 (71,2%)	4 (50,0%)	1 (20%)	3 (60%)	
Chirurg. Eingriff	D	64 (43,0%)	39 (30,1%)	12 (52,2%)	5 (29,4%)	5 (45,5%)	3 (60%)
	A	44 (56,4%)	34 (57,6%)	5 (62,5%)	3 (60%)	2 (40%)	
Tumor (solide)	D	36 (24,2%)	28 (76,5%)	7 (30,4%)	1 (5,9%)		
	A	8 (10,3%)	3 (5,1%)	2 (25,0%)	2 (40%)	1 (20%)	
Cortico-steroide	D	24 (16,1%)	17 (18,3%)	4 (17,4%)	1 (5,9%)	2 (18,2%)	
	A	15 (19,2%)	10 (16,9%)	2 (25,0%)	1 (20%)	2 (40%)	
Chemo-therapie	D	8 (5,4%)	4 (4,3%)	1 (4,4%)	1 (5,9%)	2 (18,2%)	
	A	9 (11,5%)	3 (5,1%)	2 (25,0%)	3 (60%)	1 (20%)	
Haemato-Onkologie	D	7 (4,7%)	4 (4,3%)	1 (4,4%)		2 (18,2%)	
	A	5 (6,4%)	1 (1,7%)	1 (12,5%)	1 (20%)	2 (40%)	
Transplantat	D	3 (2,0%)	1 (1,1%)	1 (4,4%)		1 (9,1%)	
	A	8 (10,3%)	5 (8,5%)	2 (25,0%)		1 (20%)	
HIV	D	1 (0,7%)		1 (4,4%)			
	A	2 (2,6%)	1 (1,7%)	1 (12,5%)			
Frühgeburt	D	1 (0,7%)	1 (1,1%)				
	A	11 (14,1%)	10 (16,9%)			1 (20%)	

Die Anzahl der Risikofaktoren im Vorfeld der Candidämie zeigte eine deutliche Verschiebung zwischen den deutschen und österreichischen Patienten. So ergaben die Daten der deutschen Patienten im Durchschnitt zwei bis drei Risikofaktoren pro Patient bei Diagnose der Candidämie. Die österreichischen Patienten lagen im Vergleich dazu höher, mit im Schnitt drei bis vier Risikofaktoren vor Ausbruch der Candidämie. Nur einer (1,3%) der 78 österreichischen Patienten hatte im Vorfeld seiner Candidämie einen einzigen Risikofaktor, während 26 (17,4%) der deutschen Patienten mit nur einem Risikofaktor eine Candidämie entwickelten.

Bei den deutschen Daten hatten Patienten mit *C. glabrata*-Candidämien die meisten Risikofaktoren (durchschnittlich 3,04) gefolgt von Patienten mit *C. albicans*- und *C. parapsilosis*-Candidämien (durchschnittlich 2,6 bzw 2,36 Risikofaktoren).

Unter den österreichischen Patienten hatten die mit *C. parapsilosis*-Candidämie die meisten Risikofaktoren (durchschnittlich 4,2) gefolgt von denen mit *C. glabrata*- und *C. albicans*-Candidämie (durchschnittlich 3,6 bzw. 3,4).

Die niedrigste Anzahl an Risikofaktoren wiesen deutsche und österreichische Patienten mit *C. tropicalis*-Candidämie auf (durchschnittlich 1,88 bzw. 3). Patienten mit Blutkulturisolaten durch seltene *Candida*-Spezies hatten Länderübergreifend unterdurchschnittlich weniger Risikofaktoren (D: 1,8; A: 1). Tabelle 4.5 stellt diese Daten detailliert dar.

Tabelle 4.5: Die Anzahl der Risikofaktoren im Vorfeld der Candidämie bezogen auf die Gesamtzahl (N / %) der *Candida*-Stämme und unterschieden auf die Zahl (N / %) der jeweiligen *Candida*-Spezies. Berechnung der durchschnittlichen Anzahl der Risikofaktoren für die Gesamtzahl der *Candida*-Stämme und für die jeweiligen Spezies. Unterteilung der Tabelle in deutsche (D) und österreichische (A) Daten.

Anzahl der Risikofaktoren		insgesamt		<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. parapsilosis</i>		andere
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
1	D	26	17,4%	13	14,0%	3	13,0%	6	35,3%	3	27,3%	1
	A	1	1,3%									1
2	D	45	30,2%	31	33,3%	6	26,1%	2	11,8%	2	18,2%	4
	A	16	20,5%	12	20,3%	2	25,0%	2	40,0%			
3	D	33	22,1%	19	20,4%	5	21,7%	6	35,3%	3	27,3%	
	A	29	37,2%	23	39,0%	3	37,5%	2	40,0%	1	20,0%	
4	D	26	17,4%	17	18,3%	6	26,1%	1	5,9%	2	18,2%	
	A	19	24,4%	16	27,1%	1	12,5%			2	40,0%	
5	D	9	6,0%	6	6,5%	2	8,7%			1	9,1%	
	A	10	12,8%	7	11,9%			1	20,0%	2	40,0%	
6	D	3	2,0%	2	2,2%	1	4,3%					
	A	3	3,8%	1	1,7%	2	25,0%					
Durchschnitt	D	2,56		2,6		3,04		1,88		2,36		1,8
	A	3,4		3,4		3,6		3		4,2		1

Auch die Anzahl der Antibiotika, die vor einer Candidämie appliziert wurden, wurde als wichtiger Risikofaktor zusätzlich ausgewertet. Während die deutschen Patienten vor der Candidämie im Schnitt mit weniger als zwei verschiedenen Präparaten behandelt wurden (durchschnittlich 1,55), erhielten die österreichischen Patienten im Schnitt mehr als 2 verschiedene Antibiotika (durchschnittlich 2,14).

Der Anteil der Patienten, die im Vorfeld ihrer Candidämie gar nicht antibiotisch behandelt wurden, war in Deutschland mit 34,2% mehr als doppelt so hoch wie in Österreich mit 14,1%.

Die Infektionen mit *C. tropicalis* gingen in beiden Ländern mit der niedrigsten durchschnittlichen Anzahl an verschiedenen Antibiosen einher (D: 1,01; A: 1,6). Die Candidämien mit den meisten vorangegangenen Antibiosen waren in Deutschland durch die Spezies *C. albicans* (durchschnittlich 1,63 Präparate) und *C. glabrata* (durchschnittlich 1,61 Präparate) verursacht.

Dagegen lagen in Österreich die Candidämien mit *C. parapsilosis* (durchschnittlich 2,8 Präparate) vor denen mit *C. albicans* (durchschnittlich 2,28 Präparate) und *C. glabrata* (durchschnittlich 2,25 Präparate). Die genaue Analyse dieser Daten ist in Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.6: Antibiotikagabe und Anzahl der verschiedenen verabreichten Antibiotika im Vorfeld der Candidämie. Hier in Bezug auf die Anzahl (N/%) der Stämme insgesamt und auf die Anzahl (N/%) der jeweiligen Spezies. Außerdem Berechnung der durchschnittlichen Anzahl der im Vorfeld verabreichten Antibiotika für die Isolate insgesamt und für die jeweiligen Spezies. Unterteilung der Tabelle in deutsche (D) und österreichische (A) Daten. Bei sieben Isolaten wurden keine Angaben hinsichtlich der stattgehabten Antibiotikatherapie gemacht.

Anzahl der Antibiotika		insgesamt	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	andere
unbekannt	D	6	2		2	2	
	A	1	1				
0	D	51 (34,2%)	32 (34,4%)	8 (34,8%)	7 (41,2%)	2 (18,2%)	2 (40,0%)
	A	11 (14,1%)	6 (10,2%)	2 (25,0%)	2 (40,0%)		1 (100%)
1	D	22 (14,8%)	12 (12,9%)	4 (17,4%)	2 (11,8%)	3 (27,3%)	1 (20,0%)
	A	14 (17,9%)	9 (15,3%)	2 (25,0%)	2 (40,0%)	1 (20,0%)	
2	D	33 (22,1%)	21 (22,6%)	3 (13,0%)	5 (29,4%)	3 (27,3%)	1 (20,0%)
	A	25 (32,1%)	21 (35,6%)	2 (25,0%)	1 (20,0%)	1 (20,0%)	
3	D	21 (14,1%)	15 (16,1%)	6 (26,1%)			
	A	15 (19,2%)	11 (18,6%)	1 (12,5%)		2 (40,0%)	
4	D	10 (6,7%)	6 (6,5%)	1 (4,3%)	1 (5,9%)	1 (9,1%)	1 (20,0%)
	A	7 (9,0%)	7 (11,9%)				
≤ 5	D	6 (4,0%)	5 (5,4%)	1 (4,3%)			
	A	6 (7,6%)	4 (6,8%)	1 (12,5%)		1 (20,0%)	
Durchschnitt	D	1,55	1,63	1,61	1,01	1,44	1,4
	A	2,14	2,28	2,25	1,6	2,8	0

4.2.3 Speziesverteilung

Die Mehrzahl der Isolate bildete in beiden Ländern die Spezies *C. albicans*, wobei sie von den 149 deutschen Isolaten 93 (62,4%) und von den 78 österreichischen Isolaten 59 (75,6%) ausmachten.

Die zweitstärkste Gruppe war die Spezies *C. glabrata*, mit 23 (15,4%) deutschen und acht (10,3%) österreichischen Isolaten.

An dritter und vierter Stelle kamen bei den deutschen Proben die Spezies *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* mit 17 (11,4%) und elf (7,4%) Isolaten. Bei den österreichischen Isolaten gab es jeweils fünf (6,4%) Stämme der Spezies *C. tropicalis* und *C. parapsilosis*.

Es gab weiterhin fünf (3,4%) Stämme seltener Spezies: zwei (1,3%) *C. lusitaniae*, und jeweils einen (0,7%) *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* und *C. norvegensis*. Bei den österreichischen Isolaten fand sich nur ein einzelner seltener Stamm (1,3%) der Spezies *C. pelliculosa*. Tabelle 4.7 zeigt die Verteilung der *Candida*-Isolate im Überblick.

Tabelle 4.7: Speziesverteilung der *Candida*-Blutisolat aus Deutschland und Österreich. Die Tabelle zeigt die Zahl der jeweiligen Isolate einer Spezies und ihren relativen Anteil (%), sowie die Gesamtstammzahlen für beide Länder. Es zeigt sich eine Übereinstimmung der anteilmäßigen Rangfolge der Spezies für Deutschland im Vergleich zu Österreich. Dennoch kann für die deutschen Isolate im Vergleich zu den österreichischen ein abnehmender Trend im prozentualen Anteil der *C. albicans*-Stämme zugunsten von *C. glabrata*- und *C. tropicalis*-Stämmen festgestellt werden.

	Deutschland (%)	Österreich (%)	Gesamt (%)
<i>C. albicans</i>	93 (62,4)	59 (75,6)	152 (67,0)
<i>C. glabrata</i>	23 (15,4)	8 (10,3)	31 (13,7)
<i>C. tropicalis</i>	17 (11,4)	5 (6,4)	22 (9,7)
<i>C. parapsilosis</i>	11 (7,4)	5 (6,4)	16 (7,0)
<i>C. lusitaniae</i>	2 (1,3)	0	2 (0,9)
<i>C. dubliniensis</i>	1 (0,7)	0	1 (0,4)
<i>C. guilliermondii</i>	1 (0,7)	0	1 (0,4)
<i>C. norvegensis</i>	1 (0,7)	0	1 (0,4)
<i>C. pelliculosa</i>	0	1 (1,3)	1 (0,4)
Insgesamt	149	78	227

4.2.4 Speziesverteilung in Bezug auf das Patientenalter

Die Unterschiede im mittleren Alter bezogen auf die Erkrankung mit den verschiedenen *Candida*-Spezies wurden Länder-übergreifend deutlich.

So lag das mittlere Erkrankungsalter bei Patienten mit Blutkulturen aus denen *C. parapsilosis* isoliert worden war sehr niedrig zwischen 44 (D) und 36 Jahren (A). Dagegen ergab sich für *C. glabrata* ein hohes mittleres Patientenalter von 62 (D) bzw. 61 Jahren (A).

Auch *C. tropicalis* wurde bevorzugt bei älterem Patienten Klientel gefunden (Durchschnittsalter 59 (D) und 68 Jahre (A)). Hierbei gab es einen auffälligen Unterschied zwischen dem jungen Durchschnittsalter der deutschen Patientinnen mit nur 44 Jahren und dem der österreichischen Patientinnen mit 74 Jahren. Leider lässt sich durch die zu geringe Anzahl der *C. tropicalis*-Isolate, aus deren Daten diese Ergebnisse errechnet wurden, auch ein Zufall nicht ausschließen.

Nur mit *C. albicans* infizierte Blutproben waren in allen Altersgruppen zu finden. Das Durchschnittsalter der Patienten lag jedoch im mittleren bis jungen Altersbereich. Für die deutschen Isolate ergab sich ein Durchschnittsalter von 55 Jahren. Das Durchschnittsalter der österreichischen Patienten mit *C. albicans*-Infektion war mit 46 Jahren dagegen ca. neun Jahre niedriger.

Detaillierte Darstellungen der Daten liefern Tabelle 4.3 und Abbildung 4.9.

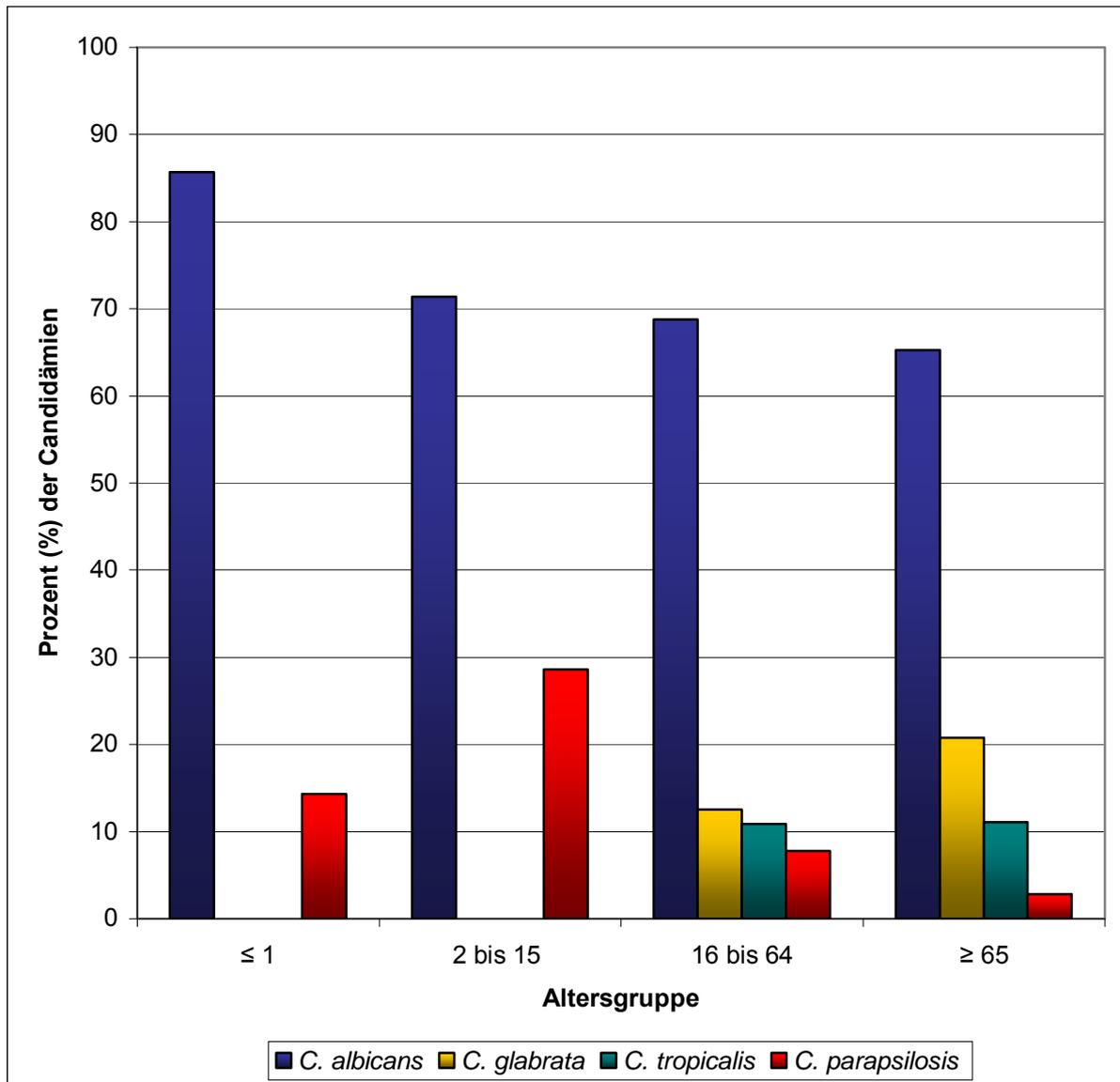


Abbildung 4.9: Anteil der Spezies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* an den Candidämien der einzelnen Altersgruppen. Es zeigte sich ein deutlich häufigeres Vorkommen der Spezies *C. glabrata* und *C. tropicalis* bei älteren und der Spezies *C. parapsilosis* bei jüngeren Patienten. Der größte Anteil der Candidämien wurde in allen Altersgruppen durch *C. albicans* verursacht, wobei der Prozentsatz an *C. albicans* mit steigendem Alter der Patienten leicht abnahm.

4.3. Ergebnisse der Mikrodilutionstestung

4.3.1 Fluconazol

4.3.1.1 *Candida albicans*

Unter den 93 deutschen *C. albicans*-Isolaten gab es keine Resistenzen, alle Isolate reagierten sensibel auf Fluconazol. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste die Konzentrationsstufen von $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 8\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag für Fluconazol bei $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $1\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.10 und Tabelle 4.8).

Auch von den 59 österreichischen *C. albicans*-Isolaten waren alle als sensibel einzustufen. Auch die Bandbreite der Ergebnisse umfasste wie bei den deutschen Isolaten die Konzentrationsstufen von $\leq 0,25\text{mg/ml}$ bis $\leq 8\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag gegenüber den deutschen Isolaten eine Konzentrationsstufe höher bei $0,5\mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} zwei Konzentrationsstufen höher bei $4\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.11 und Tabelle 4.8).

4.3.1.2 *Candida glabrata*

Unter den 23 deutschen *C. glabrata*-Isolaten gab es 20 (87%) sensible, zwei (8,7%) dosisabhängig sensible und einen (4,3%) resistent getesteten Stamm. Die Bandbreite der MHKs umfasste das gesamte getestete Spektrum von $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$ bis $\geq 128\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag bei $4\mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $16\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.10 und Tabelle 4.8).

Unter den acht österreichischen *C. glabrata*-Isolaten gab es sieben (87,5%) sensible und einen (12,5%) dosisabhängig sensiblen Stamm. Resistenzen wurden nicht festgestellt. Die Bandbreite der MHKs lag zwischen $\geq 2\mu\text{g/ml}$ und $\leq 16\mu\text{g/ml}$. Im Gegensatz zu den deutschen Isolaten wurden keine MHKs im niedrig sensiblen Konzentrationsbereich getestet. Die MHK_{50} mit $4\mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} mit $16\mu\text{g/ml}$ entsprachen jedoch den Werten der deutschen Isolate (Abbildung 4.11 und Tabelle 4.8).

4.3.1.3 *Candida tropicalis*

Von den 17 deutschen *C. tropicalis*-Isolaten waren 14 (82,4%) sensibel und drei (17,6%) resistent. Es gab keine MHK-Ergebnisse im dosisabhängigen Konzentrationsbereich. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste das gesamte Konzentrationsspektrum von $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$ bis $\geq 128\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} war $1\mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} $128\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.10 und Tabelle 4.8).

Unter den fünf österreichischen Stämmen waren vier (80%) sensibel und einer (20%) dosisabhängig sensibel. Resistenzen gegen Fluconazol gab es im Gegensatz zu den deutschen *C. tropicalis* nicht. Die Bandbreite der MHK-Ergebnisse reichte von $\geq 1\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 16\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag bei $4\mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $16\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.11 und Tabelle 4.8).

4.3.1.4 *Candida parapsilosis*

Neun der elf deutschen *C. parapsilosis*-Isolate (81,8%) waren unter Fluconazol klar als sensibel, einer (9,1%) als dosisabhängig sensibel und einer (9,1%) als resistent einzustufen. Die Bandbreite der MHKs lag im Bereich von $\geq 0,5\mu\text{g/ml}$ bis $\geq 128\mu\text{g/ml}$. Der Wert der MHK_{50} war $1\mu\text{g/ml}$ und der der MHK_{90} $16\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.10 und Tabelle 4.8).

Dagegen waren die fünf österreichischen *C. parapsilosis*-Isolate alle sensibel. Die Bandbreite der MHKs umfasste nur die zwei Konzentrationsstufen: $1\mu\text{g/ml}$ und $2\mu\text{g/ml}$. Sowohl die MHK_{50} , als auch die MHK_{90} betragen $2\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.11 und Tabelle 4.8).

4.3.1.5 Seltene Spezies

Unter den deutschen Stämmen befanden sich fünf seltenere Spezies. Jeweils ein Stamm der Spezies *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* und *C. norvegensis* sowie zwei der Spezies *C. lusitaniae*. Alle reagierten sensibel auf Fluconazol.

Unter den österreichischen Stämmen gab es ein sensibles Isolat der Spezies *C. pelliculosa*.

4.3.1.6 Zusammenfassung Fluconazol

Für Fluconazol lagen die MHKs aller deutschen Isolate speziesunabhängig im Konzentrationsbereich von $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$ bis $\geq 128\mu\text{g/ml}$ und die der österreichischen Isolate im Konzentrationsbereich von $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 16\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} der deutschen Isolate lag bei $0,5\mu\text{g/ml}$ im sensiblen Bereich. Im Vergleich dazu war die MHK_{50} der österreichischen Isolate mit $1\mu\text{g/ml}$ zwar im sensiblen Bereich, aber eine Konzentrationsstufe höher. Die MHK_{90} der deutschen und der österreichischen Isolate lag mit $4\mu\text{g/ml}$ im sensiblen Bereich. Nur 5,4% der deutschen Isolate hatten eine MHK über $8\mu\text{g/ml}$ im dosisabhängig sensiblen (2%) bzw. über $32\mu\text{g/ml}$ im resistenten (3,4%) Konzentrationsbereich. Dagegen zeigten nur 2,6% der österreichischen Isolate eine MHK im dosisabhängig sensiblen Bereich und es gab keine Resistenzen (Tabellen 4.8 und 4.9).

Im Speziesvergleich zeigte bei den deutschen Isolaten die Spezies *C. parapsilosis* mit 18,2% (davon 9,1% dosisabhängig sensibel), vor der Spezies *C. tropicalis* mit 17,6% und der Spezies *C. glabrata* mit 13% (davon 4,3% dosisabhängig sensibel) die höchsten „Resistenzraten“ gegen Fluconazol. Dagegen hatte bei den österreichischen Isolaten nur die Spezies *C. tropicalis* mit 20% (alle dosisabhängig sensibel) eine vergleichbar hohe Resistenzrate. Bei der Spezies *C. glabrata* ergab sich eine Rate von 12% dosisabhängig sensibler Stämme und die Spezies *C. parapsilosis* war komplett sensibel.

Die Resistenzrate in der Spezies *C. albicans* war bei den deutschen und österreichischen Isolaten gleich null, alle *C. albicans* Isolate waren fluconazolsensibel (Tabelle 4.8).

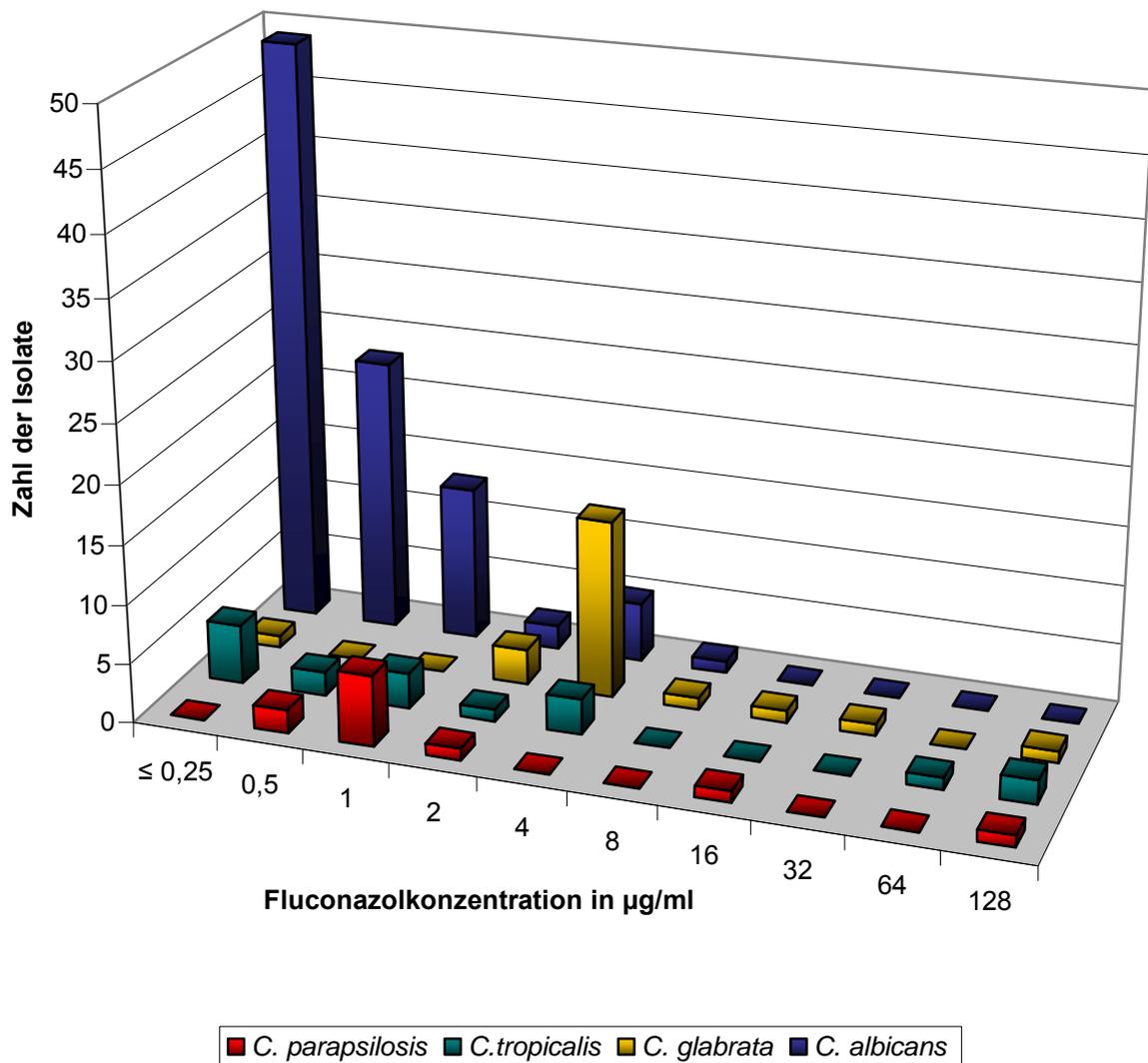


Abbildung 4.10: Fluconazol-Testergebnisse der deutschen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK aller *C. albicans*-Isolate und die der meisten nicht-albicans-Isolate liegt im sensiblen Bereich von $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$ bis $8 \mu\text{g/ml}$. Dabei finden sich die Isolate der Spezies *C. albicans* und *C. tropicalis* eher im niedrigsensiblen Bereich und die der Spezies *C. parapsilosis* und *C. glabrata* bei den mittleren bis höheren Konzentrationen des sensiblen Bereichs. Im dosisabhängig sensiblen Konzentrationsbereich von $16 \mu\text{g/ml}$ und $32 \mu\text{g/ml}$ liegen nur wenige Isolate der Species *C. glabrata* und *C. parapsilosis*. Im resistenten Konzentrationsbereich ab $64 \mu\text{g/ml}$ sind einige hochresistente Stämme der nicht-albicans-Spezies zu finden.

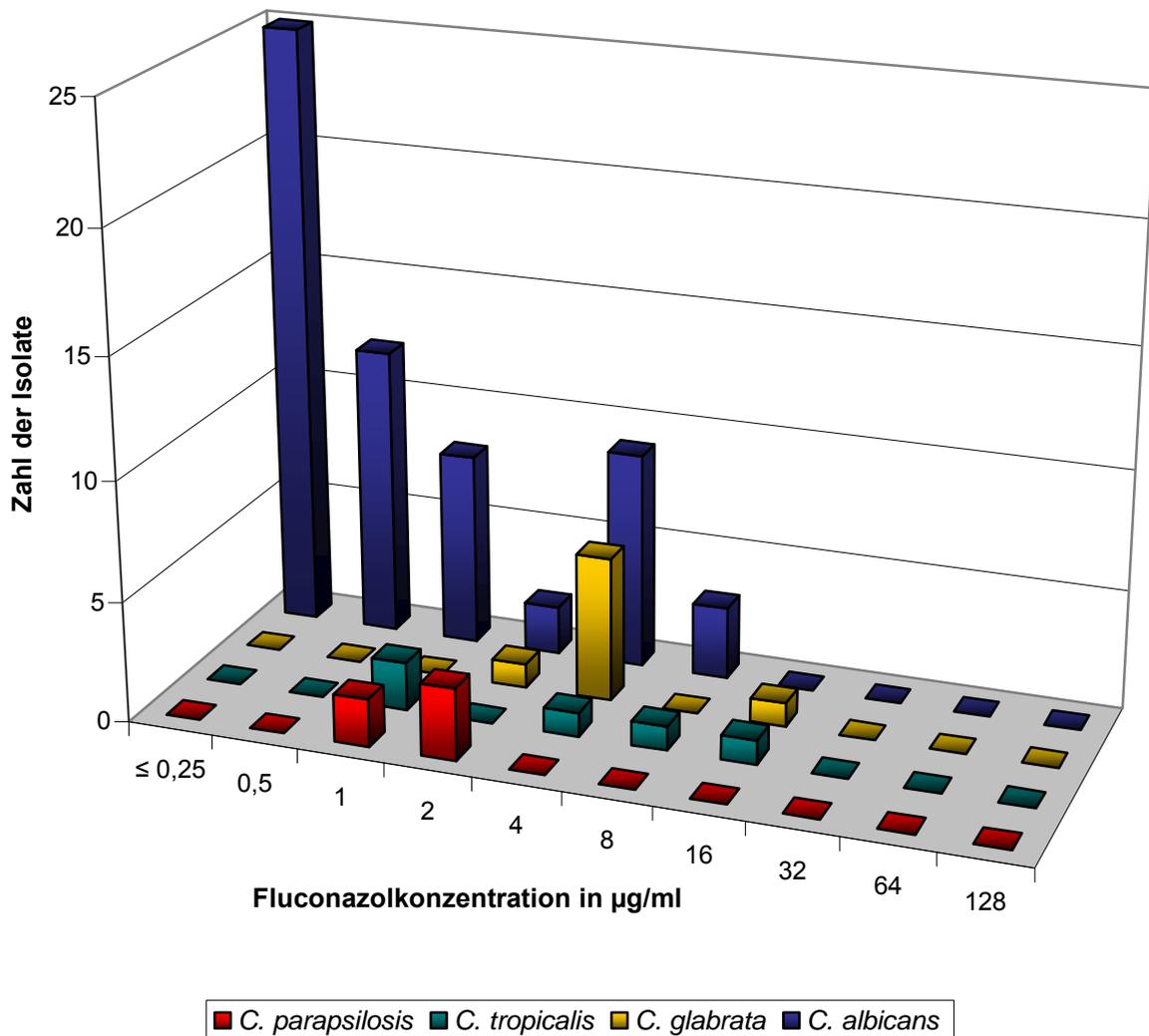


Abbildung 4.11: Fluconazol-Testergebnisse der österreichischen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK aller *C. albicans*-Isolate und die der meisten nicht-*albicans*-Isolate liegt im sensiblen Bereich von $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$ bis $8\mu\text{g/ml}$. Dabei finden sich die Isolate der Spezies *C. albicans* eher im niedrigsensiblen Bereich und die der Spezies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. glabrata* bei den mittleren bis höheren Konzentrationen des sensiblen Bereichs. Im dosisabhängig sensiblen Konzentrationsbereich von $16\mu\text{g/ml}$ und $32\mu\text{g/ml}$ liegt nur jeweils ein Isolat der Species *C. glabrata* und *C. tropicalis*. Es gibt keine Isolate mit einer MHK im resistenten Konzentrationsbereich ab $64\mu\text{g/ml}$.

4.3.2 Itraconazol

4.3.2.1 *Candida albicans*

Unter den 93 deutschen *C. albicans*-Isolaten gab es keine Resistenzen, alle Isolate reagierten sensibel auf Itraconazol. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste die Konzentrationsstufen von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag für Itraconazol bei $0,0625 \mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $0,125 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.12 und Tabelle 4.8).

Von den 59 österreichischen *C. albicans*-Isolaten waren dagegen 57 (96,6%) als sensibel einzustufen. Ein Isolat (1,7%) war dosisabhängig sensibel und ein weiteres Isolat (1,7%) war resistent. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste die Konzentrationsstufen von $\leq 0,0313 \text{mg/ml}$ bis $\leq 1 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag wie bei den deutschen Isolaten bei $0,0625 \mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $0,125 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.13 und Tabelle 4.8).

4.3.2.2 *Candida glabrata*

Unter den 23 deutschen *C. glabrata* gab es drei (13%) sensible, 15 (65%) dosisabhängig sensible und fünf (22%) resistent getestete Isolate. Die Bandbreite der MHKs umfasste ein Spektrum von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\leq 2 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag bei $0,5 \mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $2 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.12 und Tabelle 4.8).

Unter den acht österreichischen *C. glabrata* gab es einen (12,5%) sensiblen, sechs (75%) dosisabhängig sensible und einen (12,5%) resistenten Stamm. Die Bandbreite der MHKs lag zwischen $\geq 0,125 \mu\text{g/ml}$ und $\leq 1 \mu\text{g/ml}$. Im Gegensatz zu den deutschen Isolaten wurden keine MHKs im niedrig sensiblen Konzentrationsbereich getestet. Die MHK_{50} mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ entsprach jedoch dem MHK_{50} Wert der deutschen Isolate. Die MHK_{90} lag mit $1 \mu\text{g/ml}$ eine Konzentrationsstufe unter der deutschen MHK_{90} (Abbildung 4.13 und Tabelle 4.8).

4.3.2.3 *Candida tropicalis*

Von den 17 deutschen *C. tropicalis*-Isolaten waren 13 (76,6%) sensibel, zwei (11,8%) dosisabhängig sensibel und einer (5,9%) resistent. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste ein Spektrum von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} war $0,125 \mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} $1 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.12 und Tabelle 4.8).

Unter den fünf österreichischen Stämmen waren drei (60%) sensibel, einer (20%) dosisabhängig sensibel und einer (20%) resistent. Die Bandbreite der MHKs reichte von $\geq 0,125 \mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1 \mu\text{g/ml}$. Im Gegensatz zu den deutschen Isolaten wurden keine MHKs im niedrig sensiblen Konzentrationsbereich getestet. Entsprechend den deutschen Werten lag aber die MHK_{50} bei $0,125 \mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $1 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.13 und Tabelle 4.8).

4.3.2.4 *Candida parapsilosis*

Neun der elf deutschen *C. parapsilosis*-Isolate (81,8%) waren unter Itraconazol als klar sensibel und zwei (18,2%) als deutlich resistent einzustufen. Die Bandbreite der MHKs umfasste den Bereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, wobei zwischen den klar sensibel getesteten und den zwei resistenten Stämmen eine Lücke von sechs Konzentrationsstufen war. Der Wert der MHK_{50} war $0,125 \mu\text{g/ml}$ und der Wert der MHK_{90} $16 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.12 und Tabelle 4.8).

Dagegen waren die fünf österreichischen *C. parapsilosis*-Isolate alle sensibel. Die MHKs lagen alle auf einer Konzentrationsstufe bei $0,125 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.13 und Tabelle 4.8).

4.3.2.5 Seltene Spezies

Unter Itraconazol war jeweils ein Isolat der Spezies *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. norvegensis* und *C. lusitaniae* sensibel. Ein zweites Isolat der Spezies *C. lusitaniae* wurde dosisabhängig sensibel abgelesen.

Unter den österreichischen Stämmen gab es ein sensibles Isolat der Spezies *C. pelliculosa*.

4.3.2.6 Zusammenfassung Itraconazol

Für Itraconazol lagen die MHKs aller deutschen Isolate speziesunabhängig im Konzentrationsbereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ und die der österreichischen Isolate im Konzentrationsbereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} der deutschen und österreichischen Isolate lag bei $0,0625 \mu\text{g/ml}$ im sensiblen Bereich. Die MHK_{90} der deutschen und der österreichischen Isolate lag mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ im resistenten Bereich.

18,1% aller deutschen Isolate zeigten eine $\text{MHK} \geq 0,25 \mu\text{g/ml}$. 12,1% im dosisabhängig sensiblen und 6% im resistenten Konzentrationsbereich.

Dagegen zeigten nur 15,3% der österreichischen Isolate eine $\text{MHK} \geq 0,25 \mu\text{g/ml}$. 11,5% im dosisabhängig sensiblen und 3,8% im resistenten Konzentrationsbereich (Tabellen 4.8 und 4.9).

Im Vergleich zeigten sich vor allem für die Spezies *C. glabrata* höhere Konzentrationswerte unter Itraconazol. Von den deutschen Isolaten waren 15 (65%) dosisabhängig sensiblen und 5 (22%) resistent. Nur 12% der getesteten *C. glabrata* reagierten sensibel auf Itraconazol. Bei den österreichischen Isolaten lag die Rate der Itraconazol-sensiblen-Isolate sogar nur bei 10,5%. Hier gab es sechs (75%) dosisabhängig sensible und ein (12,5%) resistentes Isolat.

Von den deutschen *C. tropicalis* zeigten 23% Resistenzen, davon war eine Hälfte (11,5%) dosisabhängig sensibel und die andere (11,5%) resistent. Bei den österreichischen *C. tropicalis* war eines der fünf Isolate dosisabhängig sensibel und eines resistent.

Die deutschen *C. parapsilosis* waren bis auf zwei hochresistente Stämme sensibel gegenüber Itraconazol. Bei den österreichischen *C. parapsilosis* traten keine isolierten Resistenzen auf.

Die *C. albicans*-Isolate waren Länder-übergreifend sensibel (Tabelle 4.8).

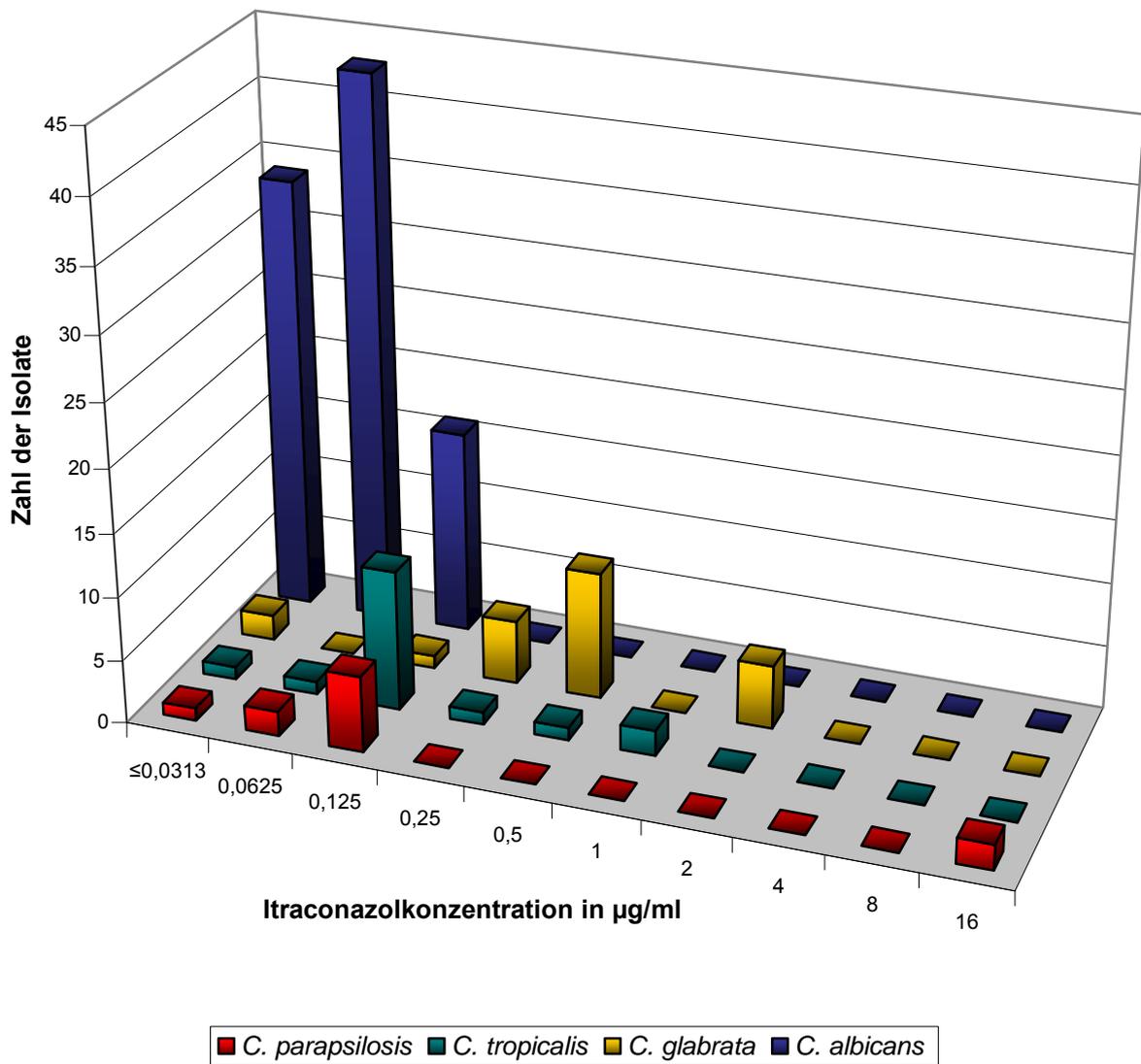


Abbildung 4.12: Itraconazol-Testergebnisse der deutschen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK aller *C. albicans*-Isolate und die der meisten nicht-*albicans*-Isolate mit Ausnahme von *C. glabrata* liegt im sensiblen Bereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $0,125 \mu\text{g/ml}$. Dabei finden sich die Isolate der Spezies *C. albicans* eher im niedrigsensiblen Bereich und die der Spezies *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* bei den mittleren bis höheren Konzentrationen des sensiblen Bereichs. Im dosisabhängig sensiblen Konzentrationsbereich von $0,25 \mu\text{g/ml}$ und $0,5 \mu\text{g/ml}$ liegen die meisten Isolate der Species *C. glabrata* und wenige *C. tropicalis*-Isolate. Im resistenten Konzentrationsbereich ab $1 \mu\text{g/ml}$ sind einige niedrigresistente Stämme der Spezies *C. glabrata* und *C. tropicalis* und wenige hochresistente Stämme der Spezies *C. parapsilosis* zu finden.

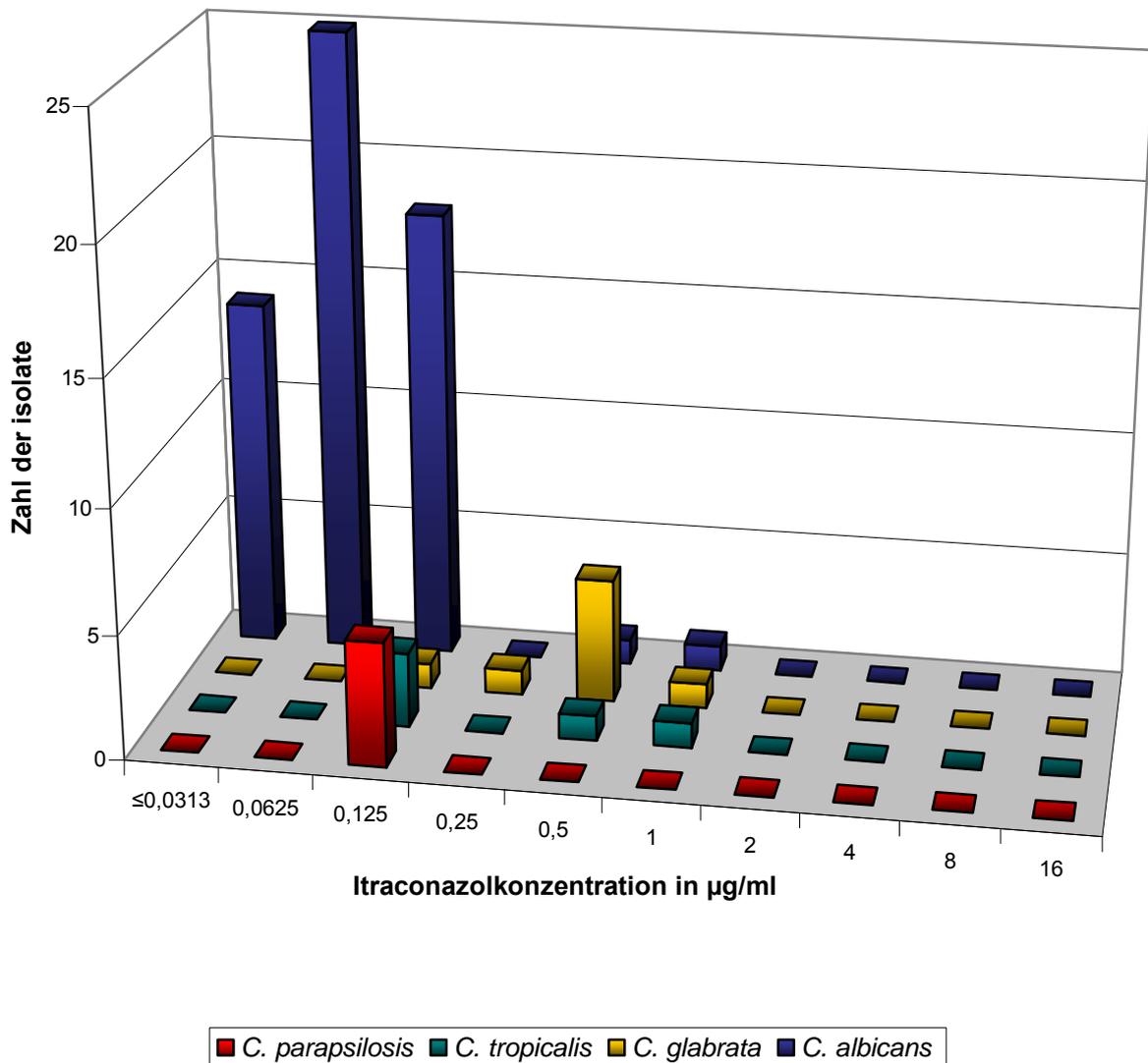


Abbildung 4.13: Itraconazol-Testergebnisse der österreichischen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK der meisten *C. albicans*-Isolate und die der meisten nicht-albicans-Isolate mit Ausnahme von *C. glabrata* liegt im sensiblen Bereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $0,125 \mu\text{g/ml}$. Dabei finden sich die Isolate der Spezies *C. albicans* im gesamten sensiblen Bereich und die der Spezies *C. tropicalis* und alle Isolate der Spezies *C. parapsilosis* bei den höheren, sensiblen Konzentrationen. Im dosisabhängig sensiblen Konzentrationsbereich von $0,25 \mu\text{g/ml}$ und $0,5 \mu\text{g/ml}$ liegen die meisten Isolate der Species *C. glabrata* und wenige *C. albicans*- und *C. tropicalis*-Isolate. Im resistenten Konzentrationsbereich ab $1 \mu\text{g/ml}$ sind einige niedrigresistente Stämme der Spezies *C. albicans*, *C. glabrata* und *C. tropicalis* zu finden.

4.3.3 Voriconazol

4.3.3.1 *Candida albicans*

Unter den 93 deutschen *C. albicans*-Isolaten gab es keine Resistenzen, alle Isolate reagierten sensibel auf Voriconazol. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste die Konzentrationsstufen von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag für Voriconazol bei $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $0,125 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.14 und Tabelle 4.8).

Auch von den 59 österreichischen *C. albicans*-Isolaten waren alle als sensibel einzustufen. Die Bandbreite der Ergebnisse war im Vergleich zu den deutschen Isolaten etwas schmaler und umfasste die Konzentrationsstufen von $\leq 0,0313 \text{mg/ml}$ bis $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} war wie auch bei den deutschen Isolaten sehr niedrig bei $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{90} war eine Konzentrationsstufen höher als die der deutschen Isolate bei $0,25 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.15 und Tabelle 4.8).

4.3.3.2 *Candida glabrata*

Unter den 23 deutschen *C. glabrata* gab es 22 (96%) sensible und ein (4%) dosisabhängig sensibles Isolat. Resistenzen traten nicht auf. Die Bandbreite der MHKs umfasste ein Spektrum von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\leq 2 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag bei $0,125 \mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $0,5 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.14 und Tabelle 4.8).

Von den acht österreichischen *C. glabrata*-Isolaten waren alle sensibel. Resistenzen oder dosisabhängig sensible Isolate wie unter den deutschen Stämmen wurden nicht abgelesen. Auch die Bandbreite der MHKs zwischen $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ und $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ lag unter der der deutschen Isolate. Im Gegensatz zu den deutschen Stämmen war die MHK_{50} mit $0,0625 \mu\text{g/ml}$ eine Konzentrationsstufe niedriger. Die MHK_{90} entsprach mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ dem MHK_{90} Wert der deutschen Isolate (Abbildung 4.15 und Tabelle 4.8).

4.3.3.3 *Candida tropicalis*

Von den 17 deutschen *C. tropicalis*-Isolaten waren 14 (82,4%) sensibel und drei (17,6%) resistent. Es gab keine MHK-Ergebnisse im dosisabhängigen Konzentrationsbereich. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste das gesamte Konzentrationsspektrum von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\geq 16 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} war $0,125 \mu\text{g/ml}$ und die $\text{MHK}_{90} \geq 16 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.14 und Tabelle 4.8).

Von den fünf österreichischen Stämmen waren alle sensibel. Resistenzen gegen Voriconazol traten im Gegensatz zu den deutschen *C. tropicalis* nicht auf. Die Bandbreite der MHK-Ergebnisse reichte von $\geq 0,0625 \mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ komplett im sensiblen Bereich. Die MHK_{50} lag wie bei den deutschen Isolaten bei $0,125 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{90} war mit $1 \mu\text{g/ml}$ vier Konzentrationsstufen unter der MHK_{90} der deutschen Isolate (Abbildung 4.15 und Tabelle 4.8).

4.3.3.4 *Candida parapsilosis*

Zehn der elf deutschen *C. parapsilosis*-Isolate (91%) waren unter Voriconazol klar als sensibel und einer (9,1%) als hoch resistent einzustufen. Die Bandbreite der MHKs umfasste den Bereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, wobei zwischen den MHKs der sensiblen Isolate und der MHK des resistenten Stammes eine Lücke von fünf Konzentrationsstufen war. Der Wert der MHK_{50} war $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ und der Wert der MHK_{90} $0,5 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.14 und Tabelle 4.8).

Im Vergleich dazu waren die fünf österreichischen *C. parapsilosis*-Isolate alle klar sensibel. Die Bandbreite der MHKs umfasste nur die zwei Konzentrationsstufen $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ und $0,0625 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} war wie bei den deutschen Isolaten mit $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ sehr niedrig. Die MHK_{90} lag mit $0,0625 \mu\text{g/ml}$ drei Konzentrationsstufen unter der MHK_{90} der deutschen Isolate (Abbildung 4.14 und Tabelle 4.8).

4.3.3.5 Seltene Spezies

Jeweils ein Stamm der Spezies *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* und *C. norvegensis* sowie zwei Isolate der Spezies *C. lusitaniae* reagierten sensibel auf Voriconazol.

Unter den österreichischen Stämmen gab es ein sensibles Isolate der Spezies *C. pelliculosa*.

4.3.3.6 Zusammenfassung Voriconazol

Für Voriconazol lagen die MHKs aller deutschen Isolate speziesunabhängig im Konzentrationsbereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ und die der österreichischen Isolate im Konzentrationsbereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} der deutschen Isolate lag mit $0,0625 \mu\text{g/ml}$ im sensiblen Bereich. Dagegen war die MHK_{50} der österreichischen Isolate eine Konzentrationsstufe tiefer bei nur $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$. Die MHK_{90} der deutschen Isolate mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ im sensiblen Bereich. Auch hier lag die MHK_{90} der österreichischen Isolate tiefer bei einer Konzentration von $0,25 \mu\text{g/ml}$. 3,4% aller deutschen Isolate zeigten eine $\text{MHK} \geq 2 \mu\text{g/ml}$ im dosisabhängig sensiblen (0,7%) bzw. $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ im resistenten (2,7%) Konzentrationsbereich. Dagegen gab es bei den österreichischen Isolaten Spezies-übergreifend keine dosisabhängig sensiblen Ergebnisse oder Resistenzen unter Voriconazol (Tabellen 4.8 und 4.9).

Im Speziesvergleich zeigten sich bei den österreichischen Isolaten Spezies-übergreifend weder Resistenzen noch dosisabhängig sensible Isolate. Dagegen gab es mit Ausnahme der komplett sensiblen *C. albicans* bei den deutschen *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* und *C. glabrata* Resistenzen. Die Spezies *C. tropicalis* zeigte mit 17,6% auch nach wiederholten Testungen die höchste Resistenzrate gegen Voriconazol. Bei den *C. parapsilosis* fand sich ein (9%) isolierter hochresistenter Stamm und unter den Isolaten der Spezies *C. glabrata* war ein dosisabhängig sensibler Stamm (Tabelle 4.8).

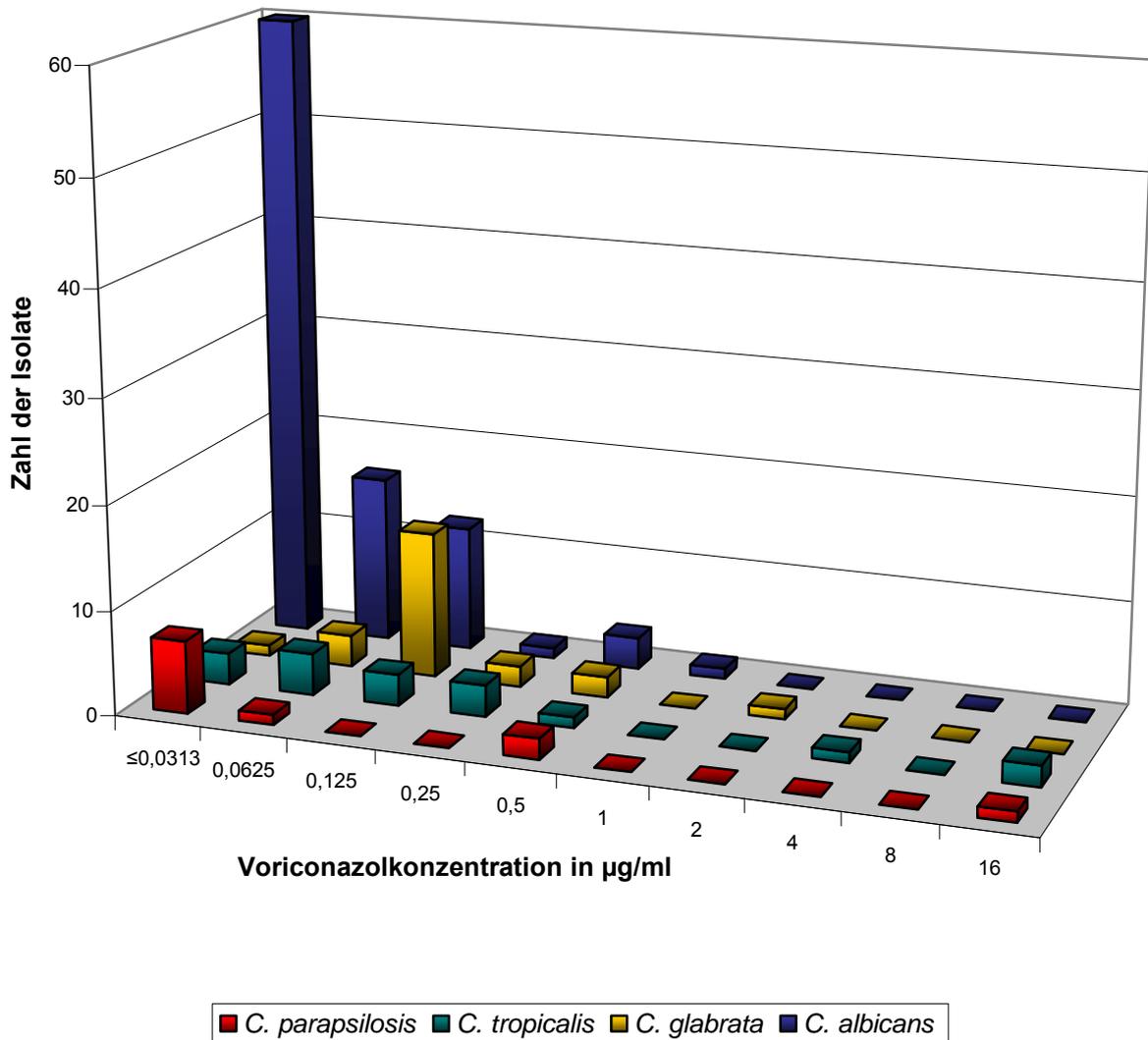


Abbildung 4.14: Voriconazol-Testergebnisse der deutschen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK aller *C. albicans*-Isolate und die der meisten nicht-*albicans*-Isolate liegt im sensiblen Bereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $1 \mu\text{g/ml}$. Im dosisabhängig sensiblen Konzentrationsbereich von $2 \mu\text{g/ml}$ liegt ein Isolat der Species *C. glabrata*. Im resistenten Konzentrationsbereich ab $4 \mu\text{g/ml}$ ein niedrigresistenter Stamm der Spezies *C. tropicalis* und wenige hochresistente Stämme der Spezies *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* zu finden.

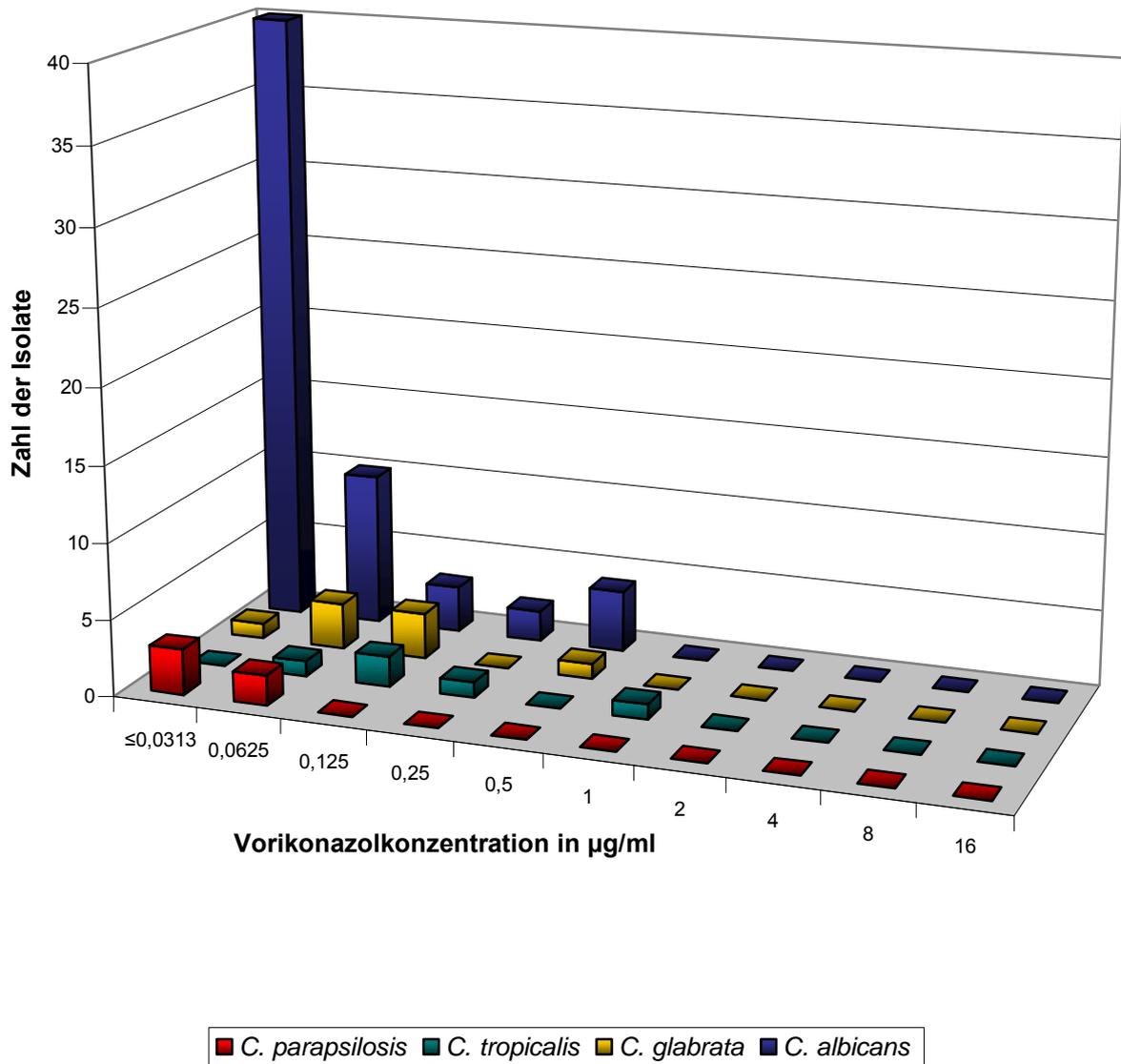


Abbildung 4.15: Voriconazol-Testergebnisse der österreichischen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK aller *C. albicans*-Isolate und die aller nicht-*albicans*-Isolate liegt im sensiblen Bereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $1 \mu\text{g/ml}$. Dabei finden sich die meisten Isolate der Spezies *C. albicans* und *C. parapsilosis* in den eher niedrigen und die der Spezies *C. tropicalis* und *C. glabrata* in den mittleren bis höheren Stufen des Konzentrationsbereichs. Im dosisabhängig sensiblen Konzentrationsbereich von $2 \mu\text{g/ml}$ und im resistenten Konzentrationsbereich ab $4 \mu\text{g/ml}$ wurde keine MHK abgelesen.

4.3.4 Co-Resistenzen bei den Azolen

Die Daten zeigen eine Co-Resistenz bei Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol. Dabei nahm die Resistenzrate von Voriconazol über Fluconazol bis hin zu Itraconazol deutlich zu (Siehe Abbildung 4.16).

Es gab fünf Stämme, die resistent gegen Fluconazol waren. Sie zeigten auch Resistenzen gegenüber Voriconazol und Itraconazol. Weitere fünf Stämme waren dosisabhängig sensibel gegenüber Fluconazol, reagierten aber auf Voriconazol sensibel. Diese Isolate, drei *C. glabrata* (zwei deutsche, ein österreichischer), ein *C. parapsilosis* (deutsch) und ein *C. tropicalis* (österreichisch) waren alle auch zumindest dosisabhängig sensibel (*C. tropicalis*) wenn nicht sogar resistent (die restlichen vier) gegenüber Itraconazol.

Zusätzlich zu diesen fünf dreifach und fünf zweifach resistenten Stämmen gab es unter Itraconazol noch sechs weitere resistente Isolate (vier deutsche, zwei österreichische) sowie 24 dosisabhängig sensible Stämme (16 deutsche, acht österreichische), die aber weder gegen Fluconazol noch gegen Voriconazol Resistenzen aufwiesen. 23 dieser 30 Isolate (76,7%) waren *C. glabrata*, was auf eine verminderte Wirksamkeit von Itraconazol gegen diese Spezies im Vergleich zu Fluconazol und Voriconazol hindeuten könnte (siehe Abbildung 4.16).

Die fünf deutschen Stämme, die nicht sensibel auf Voriconazol reagierten, waren ein *C. glabrata* (dosisabhängig sensibel), ein *C. parapsilosis* (resistent) und drei *C. tropicalis* (resistent). Diese fünf Stämme zeigten alle auch Resistenzen gegen Fluconazol und Itraconazol.

Insgesamt zeigte die Spezies *C. glabrata* die höchsten Resistenzraten bei den Azolen. Absteigend ergab sich ein einziger dosisabhängig sensiblen Stamm unter Voriconazol, einige fluconazolresistente Stämme und eine hohe Resistenzrate unter Itraconazol. Die Testung der Spezies *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* ergab vereinzelt Resistenzen gegen alle Azole mit nur leicht ansteigenden Resistenzraten von Voriconazol über Fluconazol nach Itraconazol. Wobei zwei hochresistente *C. tropicalis*-Stämme unter Voriconazol auffielen. Die Spezies *C. albicans* sowie die seltenen Spezies *C. lusitaniae* und *C. pelliculosa* waren komplett sensibel gegen Fluconazol und Voriconazol und zeigten lediglich einzelne dosisabhängig sensible und resistente Ergebnisse unter Itraconazol.

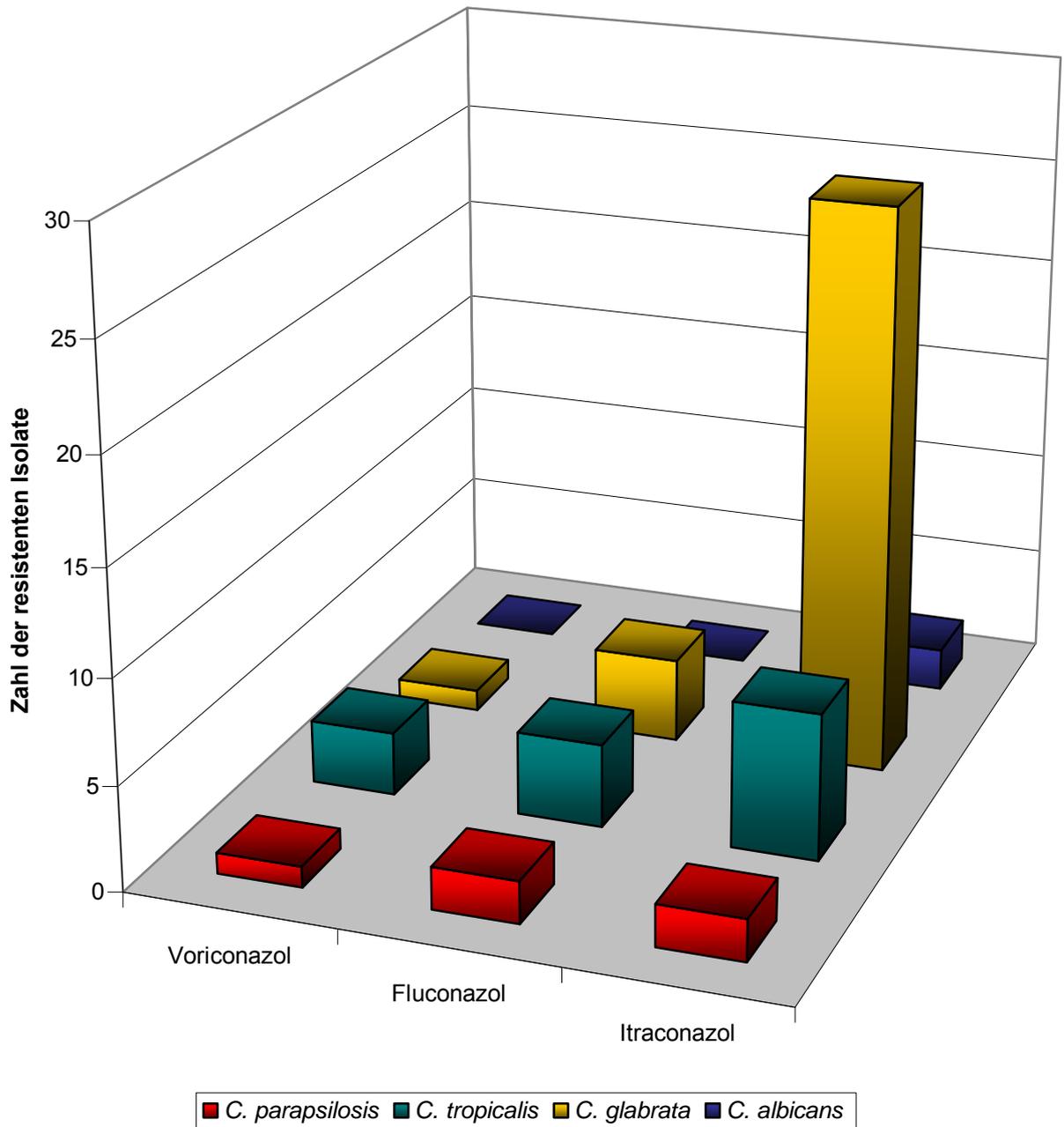


Abbildung 4.16: Anzahl der resistenten Isolate nach Spezies gegenüber den drei Azolen. Die ansteigende Zahl der resistenten Stämme von Voriconazol über Fluconazol nach Itraconazol ist bei den drei nicht-albicans-Spezies deutlich. Auch die im Vergleich hohe Rate an resistenten Stämmen der Spezies *C. glabrata* bei Itraconazol ist klar zu erkennen.

4.3.5 Amphotericin B

4.3.5.1 *Candida albicans*

Unter den 93 deutschen *C. albicans*-Isolaten gab es keine Resistenzen, alle Isolate reagierten sensibel auf Amphotericin B. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste Konzentrationsstufen von $\geq 0,125\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag für Amphotericin B bei $0,5\mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $1\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.17 und Tabelle 4.8).

Auch von den 59 österreichischen *C. albicans*-Isolaten waren alle als sensibel einzustufen. Die Bandbreite der Ergebnisse war im Vergleich zu den deutschen Isolaten etwas schmaler und umfasste die Konzentrationsstufen von $\geq 0,125\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 0,5\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} und die MHK_{90} lagen jeweils eine Konzentrationsstufe unter den entsprechenden MHKs der deutschen Isolate bei $0,25\mu\text{g/ml}$ und bei $0,5\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.18 und Tabelle 4.8).

4.3.5.2 *Candida glabrata*

Von den 23 deutschen *C. glabrata*-Isolaten waren alle sensibel auf Amphotericin B. Resistenzen traten nicht auf. Die Bandbreite der MHKs umfasste ein schmales Spektrum von $\geq 0,5\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1\mu\text{g/ml}$ im höheren sensiblen Bereich. Die MHK_{50} und die MHK_{90} lagen bei $1\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.17 und Tabelle 4.8).

Auch von den acht österreichischen *C. glabrata*-Isolaten waren alle sensibel. Die Bandbreite der MHKs zwischen $\geq 0,25\mu\text{g/ml}$ und $\leq 1\mu\text{g/ml}$ war um eine Konzentrationsstufe breiter als die der deutschen Isolate. Im Gegensatz zu den deutschen Stämmen war die MHK_{50} mit $0,5\mu\text{g/ml}$ eine Konzentrationsstufe niedriger. Die MHK_{90} entsprach mit $1\mu\text{g/ml}$ dem MHK_{90} Wert der deutschen Isolate (Abbildung 4.18 und Tabelle 4.8).

4.3.5.3 *Candida tropicalis*

Von den 17 deutschen Isolaten der Spezies *C. tropicalis* waren alle sensibel. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste das Konzentrationsspektrum von $\geq 0,125\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} und die MHK_{90} hatten beide den Wert von $1\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.17 und Tabelle 4.8).

Auch von den fünf österreichischen Stämmen reagierten alle sensibel auf Amphotericin B. Die Bandbreite der MHK-Ergebnisse war jedoch deutlich schmaler als bei den deutschen Isolaten und reichte von $\geq 0,5\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag um eine Konzentrationsstufe niedriger als bei den deutschen Isolaten bei $0,5\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{90} war mit $1\mu\text{g/ml}$ gleich der MHK_{90} der deutschen Isolate (Abbildung 4.18 und Tabelle 4.8).

4.3.5.4 *Candida parapsilosis*

Alle elf deutschen *C. parapsilosis*-Isolate waren unter Amphotericin B klar als sensibel einzustufen. Die Bandbreite der MHKs umfasste den schmalen Bereich von $\geq 0,5\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1\mu\text{g/ml}$ im oberen sensiblen Bereich. Der Wert der MHK_{50} und der MHK_{90} war $1\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.17 und Tabelle 4.8).

Auch die fünf österreichischen *C. parapsilosis*-Isolate waren klar sensibel. Die MHKs lagen alle auf einer Konzentrationsstufe von $0,5\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} und die MHK_{90} lagen mit $0,5\mu\text{g/ml}$ eine Konzentrationsstufe unter den MHKs der deutschen Isolate (Abbildung 4.18 und Tabelle 4.8).

4.3.5.5 Seltene Spezies

Jeweils ein Stamm der Spezies *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* und *C. norvegensis* sowie zwei Isolate der Spezies *C. lusitaniae* reagierten sensibel auf Amphotericin B.

Unter den österreichischen Stämmen gab es ein sensibles Isolate der Spezies *C. pelliculosa*.

4.3.5.6 Zusammenfassung Amphotericin B

Insgesamt zeigte die Mikrodilutionstestung gegenüber Amphotericin B Spezies- und Länder-übergreifend nur MHKs einer geringen Bandbreite im Bereich von 0,125µg/ml bis 1µg/ml. Die beiden niedrigsten Konzentrationsstufen 0,0313µg/ml und 0,0625µg/ml wiesen bei allen Isolaten deutliches Wachstum auf. Die MHK_{50} der deutschen und der österreichischen Isolate lag mit 0,5µg/ml im sensiblen Bereich. Die MHK_{90} der deutschen Isolate lag mit 1µg/ml im sensiblen Bereich. Dagegen lag die MHK_{90} der österreichischen Isolate etwas tiefer bei 0,5µg/ml im sensiblen Bereich. Alle deutschen und österreichischen Isolate reagierten Spezies-übergreifend sensibel auf Amphotericin B (Tabellen 4.8 und 4.9).

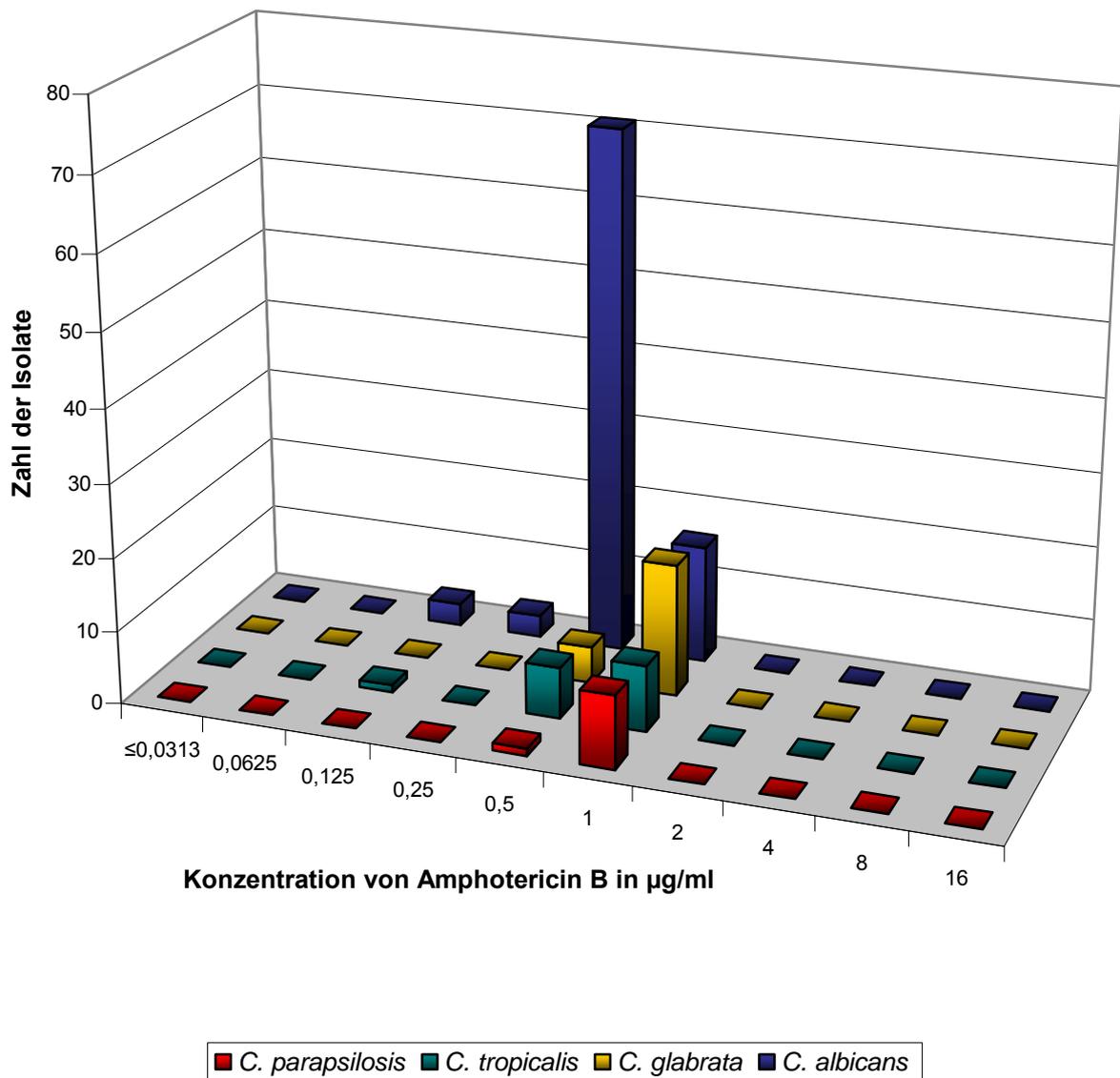


Abbildung 4.17: Amphotericin-B-Testergebnisse der deutschen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK aller Isolate liegt im sensiblen Bereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $1 \mu\text{g/ml}$. Dabei findet sich die MHK aller Isolate Spezies-übergreifend im eingeschränkten Konzentrationsbereich zwischen $0,125 \mu\text{g/ml}$ bis $1 \mu\text{g/ml}$. Im resistenten Konzentrationsbereich ab $2 \mu\text{g/ml}$ wurde keine MHK abgelesen.

Ergebnisse

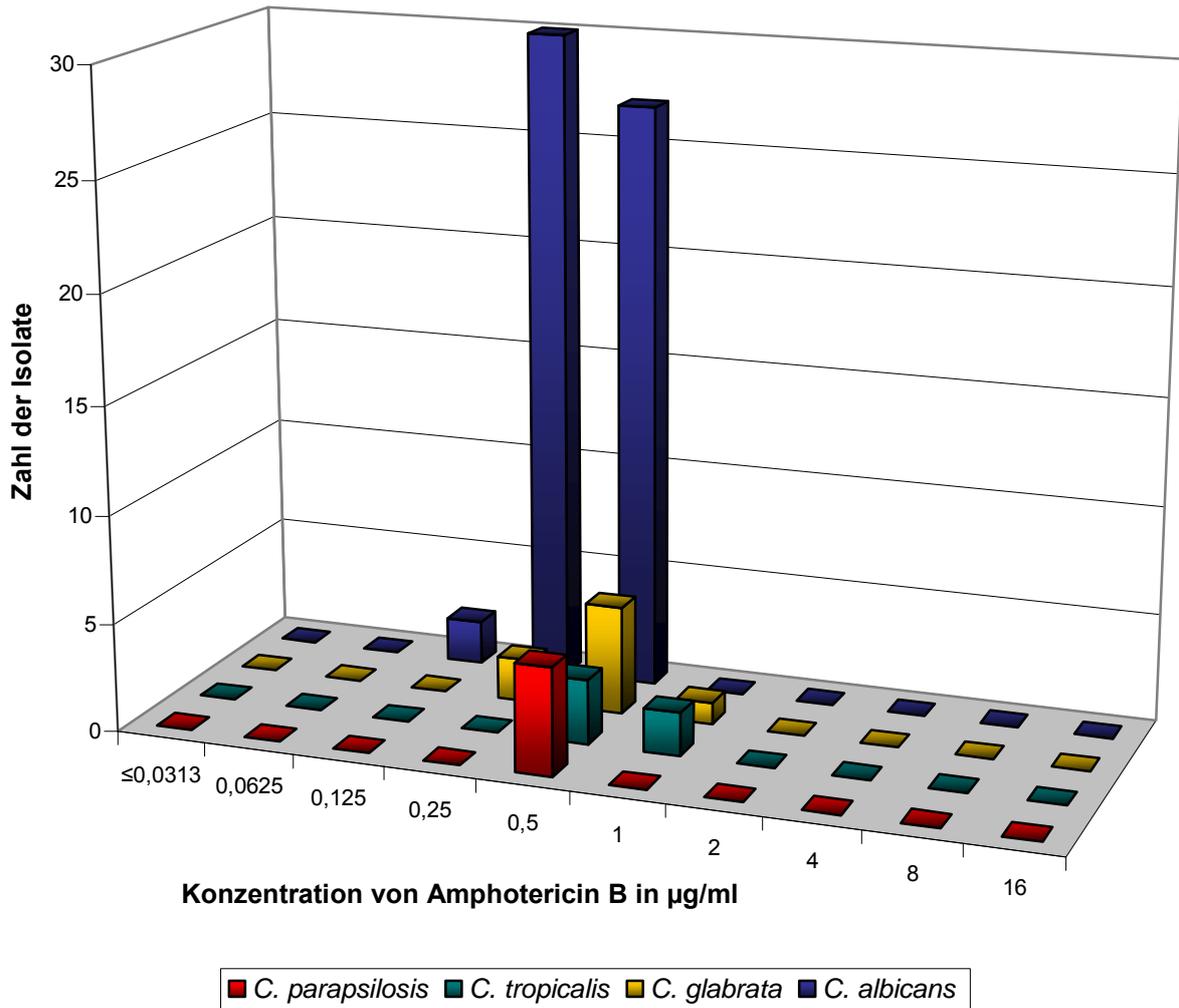


Abbildung 4.18: Amphotericin-B-Testergebnisse der österreichischen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK aller Isolate liegt im sensiblen Bereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $1 \mu\text{g/ml}$. Dabei findet sich die MHK aller Isolate Spezies-übergreifend im eingeschränkten Konzentrationsbereich zwischen $0,125 \mu\text{g/ml}$ bis $1 \mu\text{g/ml}$. Im resistenten Konzentrationsbereich ab $2 \mu\text{g/ml}$ wurde keine MHK abgelesen.

4.3.6 5-Fluorcytosin

4.3.6.1 *Candida albicans*

Unter den 93 deutschen *C. albicans*-Isolaten gab es keine Resistenzen, alle Isolate reagierten sensibel auf 5-Fluorcytosin. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste drei Konzentrationsstufen von $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 0,5\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} und die MHK_{90} lagen für 5-Fluorcytosin bei $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.19 und Tabelle 4.8).

Von den 59 österreichischen *C. albicans*-Isolaten waren 58 als sensibel einzustufen. Ein Stamm war jedoch deutlich resistent. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste wie bei den deutschen Isolaten die Konzentrationsstufen von $\leq 0,125\text{mg/ml}$ bis $\leq 0,5\mu\text{g/ml}$ für die sensiblen Stämme, jedoch lag das resistente Isolat in einem Abstand von fünf Konzentrationsstufen bei $32\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} und die MHK_{90} lagen entsprechend den deutschen Ergebnissen bei $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.20 und Tabelle 4.8).

4.3.6.2 *Candida glabrata*

Unter den 23 deutschen *C. glabrata*-Isolaten gab es 21 (91%) sensible und zwei (8,7%) hoch resistent getestete Stämme. Die Bandbreite der MHKs umfasste zwar das gesamte getestete Spektrum von $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ bis $\geq 64\mu\text{g/ml}$. Jedoch lagen die 22 sensiblen Isolate alle auf der niedrigsten Konzentrationsstufe bei $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ und die zwei resistenten Stämme auf der höchsten Konzentrationsstufe von $\geq 64\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} und die MHK_{90} lagen bei $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.19 und Tabelle 4.8).

Unter den acht österreichischen *C. glabrata* gab es nur sensible Isolate. Isolierte Resistenzen wie bei den deutschen Stämmen traten nicht auf. Die MHKs lagen alle bei der niedrigsten getesteten 5-Fluorcytosin-Konzentrationsstufe von $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} wie auch die MHK_{90} lagen auch bei $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.20 und Tabelle 4.8).

4.3.6.3 *Candida tropicalis*

Von den 17 deutschen *C. tropicalis*-Isolaten reagierten acht (47,1%) hochgradig sensibel auf 5-Fluorcytosin. Die restlichen neun Isolate verteilten sich auf die drei höchsten Konzentrationsstufen. Es gab zwei (11,7%) intermediäre und sieben (41,2%) resistente Isolate. Die Bandbreite der Ergebnisse umfasste damit das gesamte Konzentrationsspektrum von $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ bis $\geq 64\mu\text{g/ml}$ mit einer Lücke von sechs Konzentrationsstufen zwischen sensiblen und resistenten Isolaten. Die MHK_{50} war $16\mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} $\geq 64\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.19 und Tabelle 4.8).

Bei den fünf österreichischen Stämmen wurde diese Streuung der Stämme bestätigt. Vier der fünf Isolate reagierten hochgradig sensibel auf 5-Fluorcytosin und ein Isolat lag im Abstand von sieben Konzentrationsstufen im klar resistenten Konzentrationsbereich. Die Bandbreite der MHK-Ergebnisse reichte von $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 32\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag im Gegensatz zu der der deutschen Isolate im sensiblen Bereich bei $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{90} lag jedoch entsprechend dem deutschen MHK_{90} -Wert mit $32\mu\text{g/ml}$ im resistenten Bereich (Abbildung 4.20 und Tabelle 4.8).

4.3.6.4 *Candida parapsilosis*

Alle elf deutschen *C. parapsilosis*-Isolate waren auf 5-Fluorcytosin klar als sensibel einzustufen. Es gab keine Resistenzen. Sämtliche MHKs lagen bei der niedrigsten getesteten 5-Fluorcytosin-Konzentration von $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$. Die Werte von MHK_{50} und MHK_{90} lagen dementsprechend auch bei $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.19 und Tabelle 4.8).

Auch die fünf österreichischen *C. parapsilosis*-Isolate waren alle sensibel. Die Bandbreite der MHKs umfasste jedoch ein breiteres Konzentrationsspektrum von $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 2\mu\text{g/ml}$ im sensiblen Bereich. Die MHK_{50} lag bei $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{90} jedoch etwas höher bei $2\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.20 und Tabelle 4.8).

4.3.6.5 Seltene Spezies

Es gab jeweils einen sensiblen Stamm der Spezies *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* und *C. norvegensis*. Sowie jeweils ein hochresistentes Isolat der Spezies *C. lusitaniae* und *C. guilliermondii*.

Unter den österreichischen Stämmen gab es ein sensibel getestetes Isolat der Spezies *C. pelliculosa*.

4.3.6.6 Zusammenfassung 5-Fluorcytosin

Für 5-Fluorcytosin lagen die MHKs aller deutschen Isolate Spezies-unabhängig im Konzentrationsbereich von $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ bis $\geq 64\mu\text{g/ml}$ und die der österreichischen Isolate im Konzentrationsbereich von $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 32\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} der deutschen und der österreichischen Isolate lag bei einer Konzentration von $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ im sensiblen Bereich. Die MHK_{90} der deutschen Isolate lag bei einer Konzentration von $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$ im sensiblen Bereich. Dagegen lag die MHK_{90} der österreichischen Isolate bei einer höheren Konzentration von $0,5\mu\text{g/ml}$ im sensiblen Konzentrationsbereich. 8,7% der deutschen Isolate zeigten eine $\text{MHK} \geq 8\mu\text{g/ml}$. 1,3% davon lagen im intermediären Konzentrationsbereich, die restlichen 7,4% waren mit $\text{MHKs} \geq 32\mu\text{g/ml}$ resistent. Von den österreichischen Isolaten zeigten dagegen nur 2,6% eine MHK im resistenten Bereich (Tabellen 4.8 und 4.9).

Im Speziesvergleich zeigten die *C. tropicalis*-Isolate Länder-übergreifend eine deutlich erhöhte Resistenzrate. Jedoch gab es auch hier wie bei den übrigen Spezies eine geringe Streubreite der Ergebnisse. Die MHKs der Isolate lagen entweder bei einer Konzentrationsstufe im hochsensiblen oder im Abstand von mehreren Konzentrationsstufen dazu im deutlich resistenten Bereich. Bei den deutschen *C. tropicalis* wurde eine Resistenzrate von 52,9% erreicht, bei den österreichischen Isolaten eine von 20%. Alle anderen Spezies reagierten mit Ausnahme von einzelnen, hochgradig resistenten Stämmen sensibel auf 5-Fluorcytosin (Tabelle 4.8).

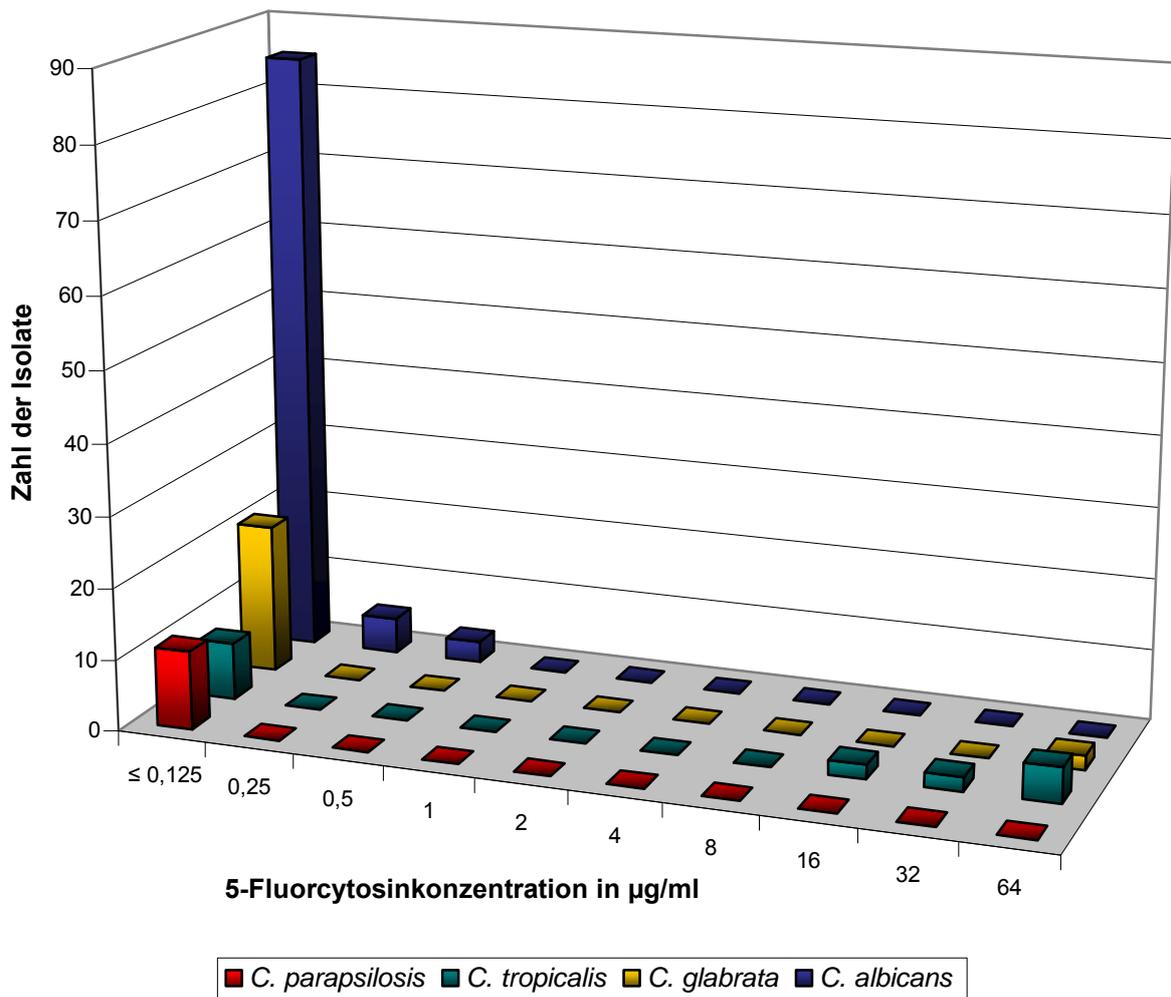


Abbildung 4.19: 5-Fluorcytosin-Testergebnisse der deutschen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK aller *C. albicans*- und *C. parapsilosis*-Isolate, die meisten *C. glabrata*-Isolate und die wenigen sensibel getesteten *C. tropicalis* lagen hier im niedrigsensiblen Bereich. Im intermediären Bereich zwischen 8µg/ml und 16µg/ml fanden sich nur zwei *C. tropicalis*-Isolate. Im resistenten Bereich über 32µg/ml fand sich fast die Hälfte der getesteten *C. tropicalis*-Isolate und zwei Isolate der Spezies *C. glabrata*.

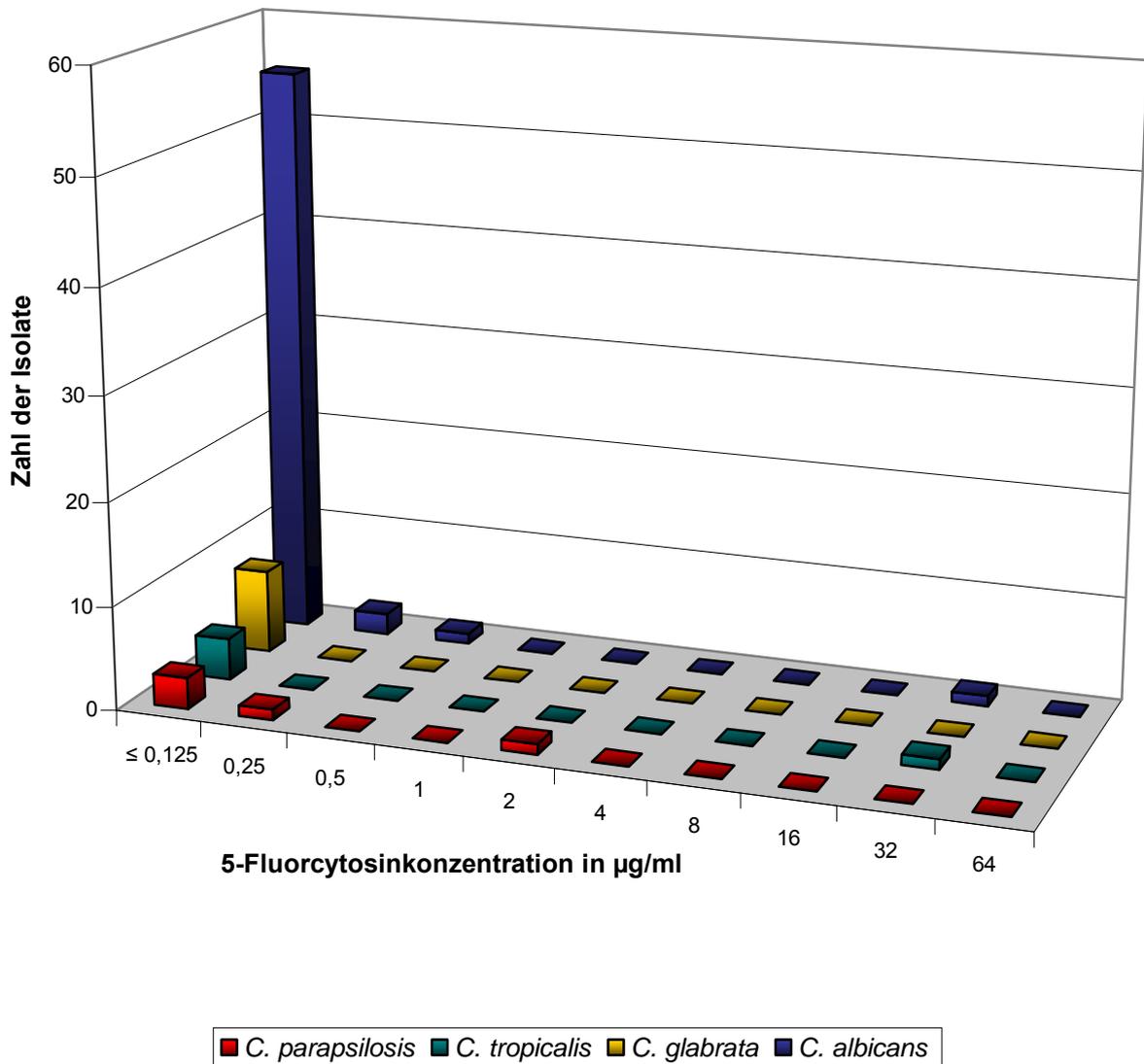


Abbildung 4.20: 5-Fluorcytosin-Testergebnisse der österreichischen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK der meisten *C. albicans*-, *C. tropicalis*- und *C. parapsilosis*-Isolate sowie aller *C. glabrata*-Isolate lagen hier im niedrigsensiblen Bereich. Ein Isolat der Spezies *C. parapsilosis* lag im höheren sensiblen Konzentrationsbereich. Im intermediären Bereich zwischen 8µg/ml und 16µg/ml wurde keine MHK abgelesen. Im resistenten Bereich über 32µg/ml fand sich jeweils ein Stamm der Spezies *C. albicans* und *C. tropicalis*.

4.3.7 Caspofungin

4.3.7.1 *Candida albicans*

Die Bandbreite der Ergebnisse der 93 deutschen Isolate der Spezies *C. albicans* umfasste die Konzentrationsstufen von $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag für Caspofungin bei $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $0,0625\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.21 und Tabelle 4.8).

Bei den 59 österreichischen *C. albicans*-Isolaten war die Bandbreite der Ergebnisse im Vergleich zu den deutschen Isolaten etwas schmaler und umfasste die Konzentrationsstufen von $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 0,0625\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} und die MHK_{90} lagen entsprechend den Werten der deutschen Isolate bei $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ und $0,0625\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.22 und Tabelle 4.8).

4.3.7.2 *Candida glabrata*

Die Bandbreite der MHKs der 23 deutschen *C. glabrata*-Isolate umfasste ein Spektrum von $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag bei $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} bei $0,0625\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.21 und Tabelle 4.8).

Bei den acht österreichischen *C. glabrata* Isolaten war die Bandbreite der MHKs zwischen $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ und $\leq 0,0625\mu\text{g/ml}$ um eine Konzentrationsstufe schmaler als die der deutschen Isolate. Die MHK_{50} und die MHK_{90} lagen entsprechend den Werten der deutsche Isolate bei $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ und $0,0625\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.22 und Tabelle 4.8).

4.3.7.3 *Candida tropicalis*

Die Bandbreite der Ergebnisse der 17 deutschen *C. tropicalis*-Isolate umfasste das Konzentrationsspektrum von $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag bei $0,0625\mu\text{g/ml}$ und die MHK_{90} hatte einen Wert von $0,125\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.21 und Tabelle 4.8).

Bei den fünf österreichischen Stämmen war die Bandbreite der MHK-Ergebnisse jedoch deutlich schmaler als bei den deutschen Isolaten und lag bei einer Konzentration von $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} und die MHK_{90} waren dementsprechend mit $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ niedriger als die Werte der deutschen Isolate (Abbildung 4.22 und Tabelle 4.8).

4.3.7.4 *Candida parapsilosis*

Die Bandbreite der Ergebnisse der deutschen *C. parapsilosis*-Isolate umfasste den Bereich von $\geq 0,125\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} lag bei $0,25\mu\text{g/ml}$ und der Wert der MHK_{90} war $0,5\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 4.21 und Tabelle 4.8).

Bei den fünf österreichischen *C. parapsilosis*-Isolaten lagen die MHKs in einem schmaleren Konzentrationspektrum von $\geq 0,25\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 0,5\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} und die MHK_{90} lagen bei $0,5\mu\text{g/ml}$ im Bereich der Werte der entsprechenden MHKs der deutschen Isolate (Abbildung 4.22 und Tabelle 4.8).

Insgesamt waren die MHK-Werte für die Isolate der Spezies *C. parapsilosis* etwa zwei Konzentrationsstufen höher als die der *C. albicans*-, *C. glabrata*- und *C. tropicalis*- Isolate (Abbildungen 4.21 und 4.22).

4.3.7.5 Seltene Spezies

Es gab jeweils ein Isolat der Spezies *C. dubliniensis* und *C. norvegensis* sowie zwei Isolate der Spezies *C. lusitaniae*. Die MHKs dieser Stämme lagen in Konzentrationsbereich von $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$. Außerdem gab es ein Isolat der Spezies *C. guilliermondii*. Bei diesem wurde eine deutlich höhere MHK von $\geq 16\mu\text{g/ml}$ getestet.

Unter den österreichischen Stämmen gab es ein Isolat der Spezies *C. pelliculosa* mit einer MHK bei der niedrigsten getesteten Konzentrationsstufe von $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$.

4.3.7.6 Zusammenfassung Caspofungin

Für Caspofungin lagen die MHKs der deutschen Isolate im Konzentrationsbereich von $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 1\mu\text{g/ml}$. Ausgenommen davon war ein Isolat der Spezies *C. guilliermondii*, welches eine MHK von $\geq 16\mu\text{g/ml}$ aufwies und damit drei Konzentrationsstufen über den MHKs der restlichen Isolate lag. Die MHKs der österreichischen Isolate lagen im Konzentrationsbereich von $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ bis $\leq 0,5\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{50} der deutschen und der österreichischen Isolate lag bei einer Konzentration von $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{90} der deutschen Isolate lag bei $0,125\mu\text{g/ml}$. Dagegen lag die MHK_{90} der österreichischen Isolate etwas niedriger bei einer Konzentration von $0,0625\mu\text{g/ml}$ (Tabellen 4.8 und 4.9).

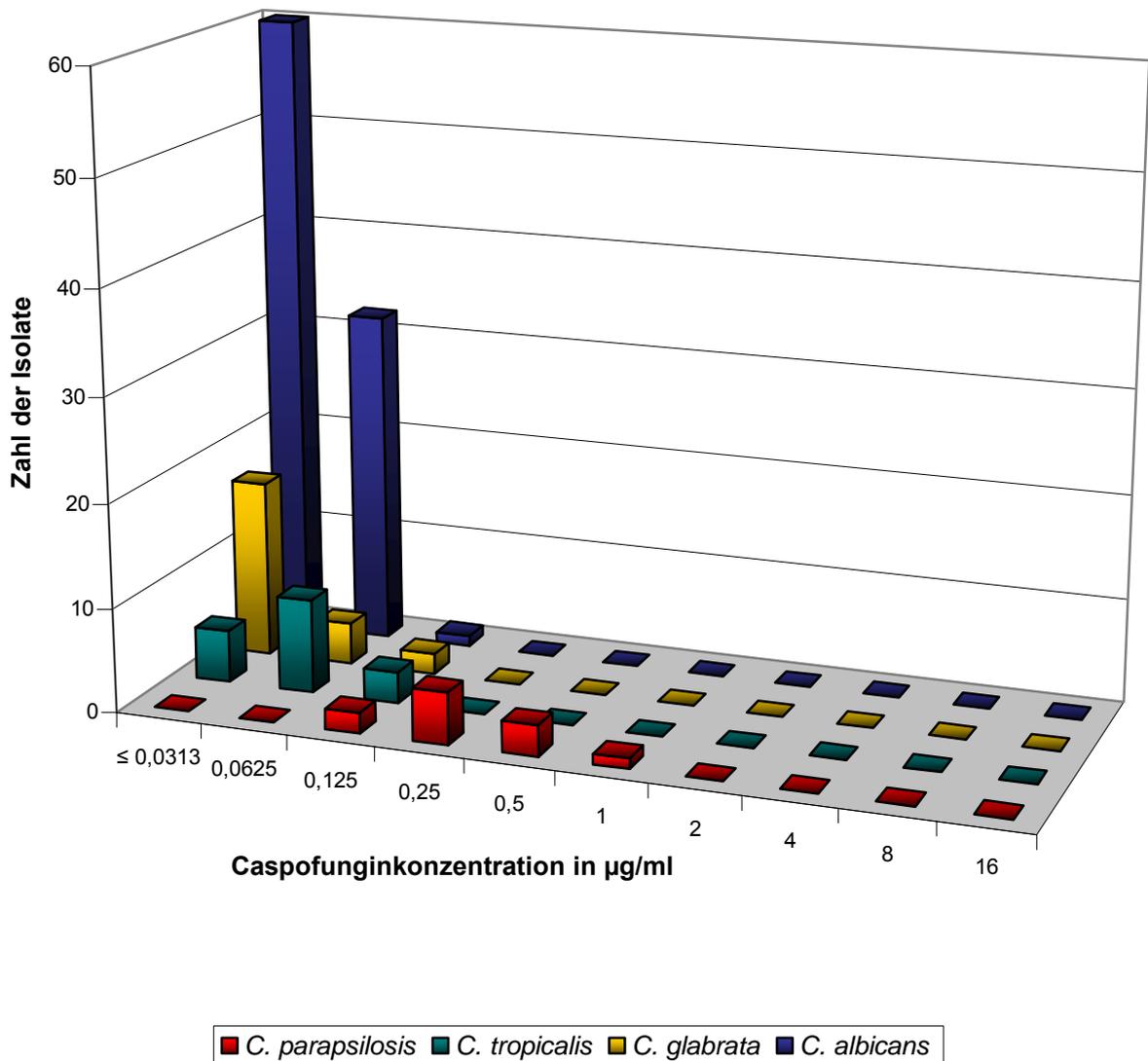


Abbildung 4.21: Caspofungin-Testergebnisse der deutschen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK der *C. albicans*-, *C. glabrata*- und *C. tropicalis*-Isolate lag im niedrigsten Konzentrationsbereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $0,125 \mu\text{g/ml}$. Die Isolate der Species *C. parapsilosis* zeigten eine höhere MHK im Bereich von $0,125 \mu\text{g/ml}$ bis $1 \mu\text{g/ml}$.

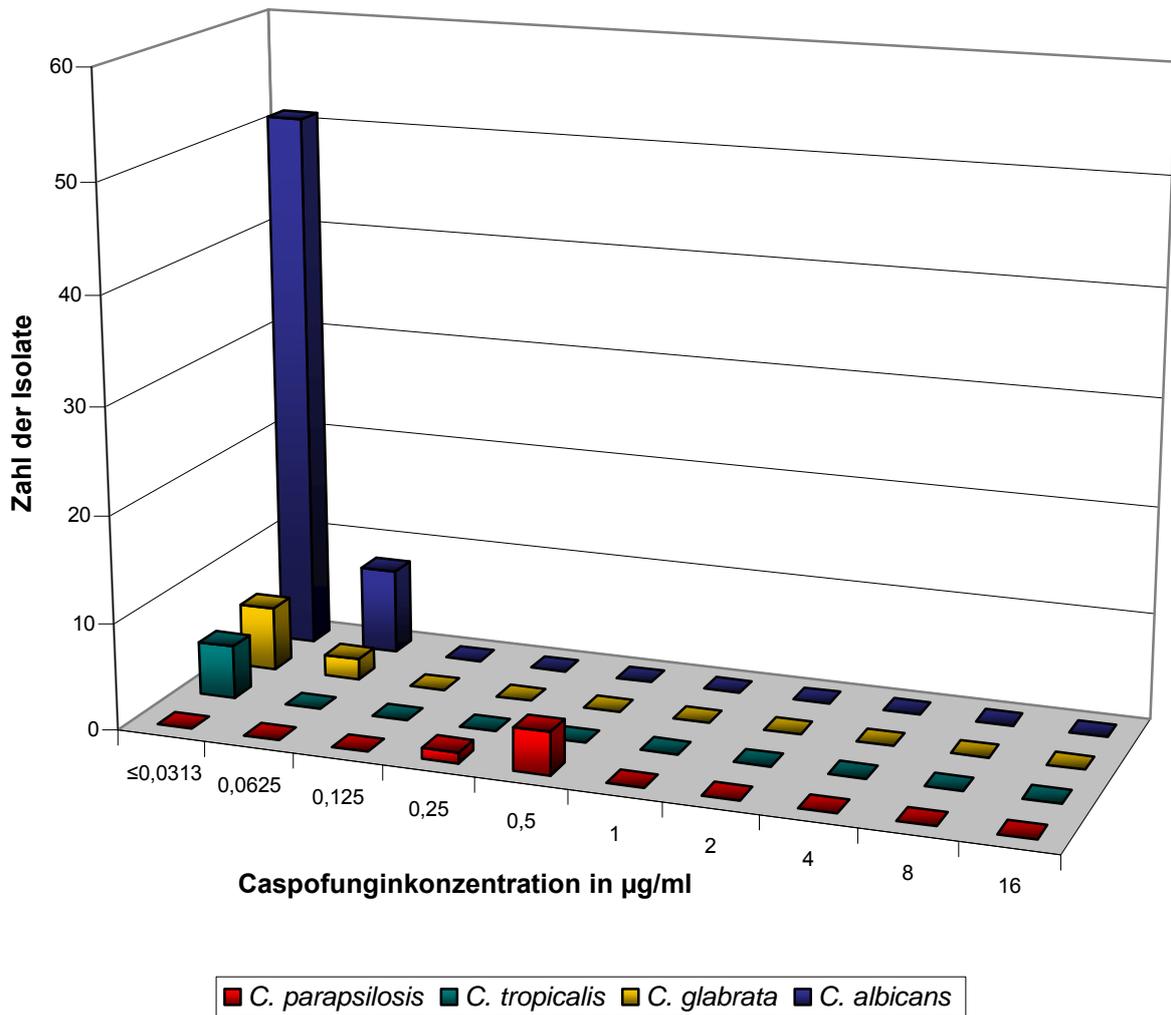


Abbildung 4.22: Caspofungin-Testergebnisse der österreichischen Isolate nach Spezies. Die Grafik zeigt für jede Konzentrationsstufe die Zahl der Isolate der jeweiligen Spezies, die mit der entsprechenden MHK getestet wurden. Die MHK der *C. albicans*-, *C. glabrata*- und *C. tropicalis*-Isolate lag im niedrigsten Konzentrationsbereich von $\leq 0,0313 \mu\text{g/ml}$ bis $0,0625 \mu\text{g/ml}$. Die Isolate der Species *C. parapsilosis* zeigten eine höhere MHK im Bereich von $0,25 \mu\text{g/ml}$ bis $0,5 \mu\text{g/ml}$.

4.4 Resistenztestung deutscher und österreichischer *Candida*-Stämme

Mittels der etablierten Mikrodilutionsmethode wurden nach den CLSI-Leitlinien die minimalen Hemmkonzentrationen der einzelnen Isolate gegen die sechs gängigsten Antimykotika ermittelt. Tabelle 4.8 und 4.9 geben einen Überblick über die MHK_{50} bzw. MHK_{90} des spezifischen Antimykotikums. Die Tabellen zeigen außerdem für jedes Antimykotikum den Konzentrationsbereich der Testergebnisse und stellen damit die Streubreite der MHKs der Isolate für ein Antimykotikum dar. Desweiteren wird die Prozentzahl (Anzahl) der Isolate dargestellt, die sensibel, dosisabhängig sensibel / intermediär oder resistent auf das jeweilige Antimykotikum reagierten.

Im Vergleich der Antimykotika zeigte Fluconazol gute Wirkung bei rund 95% und Voriconazol sogar bei über 96% aller Isolate. Itraconazol hatte mit Abstand die höchsten Resistenzraten mit Länder-übergreifend über 15% nicht sensibel getesteten Isolaten und einer deutlichen Wirkschwäche gegenüber der Spezies *C. glabrata*.

Neben Itraconazol bei den den Azolen zeigte 5-Fluorzytosin die höchste Resistenzrate mit fast 9% bei den deutschen und knapp 3% bei den österreichischen Isolaten. Auch wenn in Hinblick auf die geringe Anzahl der Isolate eine Wirkschwäche gegen die Spezies *C. tropicalis* nicht mit Sicherheit bewiesen werden kann, ist die hohe Resistenzrate besorgniserregend.

Auffallend war bei den Antimykotika die im Schnitt 3,5% höhere Resistenzrate der deutschen im Vergleich zu den österreichischen Isolaten.

Nur Amphotericin B war Spezies- und Länder-übergreifend gut wirksam, es wurden keine Resistenzen festgestellt.

Die mit Caspofungin getesteten Isolate konnten durch die noch nicht offiziell festgelegten Wachstumsgrenzen nicht wie bei den anderen Antimykotika in drei Gruppen als sensibel, dosisabhängig sensibel oder resistent eingeteilt werden. Jedoch lagen die MHKs der meisten Isolate $\leq 1\mu\text{g/ml}$. Einzige Ausnahme war ein Stamm der Spezies *C. guilliermondii*, welcher eine deutlich erhöhte MHK von $\geq 16\mu\text{g/ml}$ aufwies.

Tabelle 4.8: MHK_{50/90} und Konzentrationsbereich der MHKs nach *Candida*-Spezies und Antimykotikum für deutsche und österreichische Isolate. Alle Werte in µg/ml.

	Deutsche Isolate				Österreichische Isolate		
	Antimykotikum	MHK ₅₀	MHK ₉₀	Bereich der MHKs	MHK ₅₀	MHK ₉₀	Bereich der MHKs
Alle Isolate	Fluconazol	0,5	4	≤ 0,25 - ≥ 128	1	4	≤ 0,25 - 16
	Itraconazol	0,0625	0,5	≤ 0,0313 - ≥ 16	0,0625	0,5	≤ 0,0313 - 1
	Voriconazol	0,0625	0,5	≤ 0,0313 - ≥ 16	≤ 0,0313	0,25	≤ 0,0313 - 1
	5-Flucytosin	≤ 0,125	0,5	≤ 0,125 - ≥ 64	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125 - 32
	Caspofungin	≤ 0,0313	0,125	≤ 0,0313 - ≥ 16	≤ 0,0313	0,0625	≤ 0,0313 - 0,5
	Amphotericin B	0,5	1	0,125 - 1	0,5	0,5	0,125 - 1
<i>C. albicans</i>	Fluconazol	≤ 0,25	1	≤ 0,25 - 8	0,5	4	≤ 0,25 - 8
	Itraconazol	0,0625	0,125	≤ 0,0313 - 0,125	0,0625	0,125	≤ 0,0313 - 1
	Voriconazol	≤ 0,0313	0,125	≤ 0,0313 - 1	≤ 0,0313	0,25	≤ 0,0313 - 0,5
	5-Flucytosin	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125 - 0,5	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125 - 32
	Caspofungin	≤ 0,0313	0,0625	≤ 0,0313 - 0,125	≤ 0,0313	0,0625	≤ 0,0313 - 0,0625
	Amphotericin B	0,5	1	0,5 - 1	0,25	0,5	0,125 - 0,5
<i>C. glabrata</i>	Fluconazol	4	16	≤ 0,25 - ≥ 128	4	16	2 - 16
	Itraconazol	0,5	2	≤ 0,0313 - 2	0,5	1	0,125 - 1
	Voriconazol	0,125	0,5	≤ 0,0313 - 2	0,0625	0,5	≤ 0,0313 - 0,5
	5-Flucytosin	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125 - ≥ 64	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125
	Caspofungin	≤ 0,0313	0,0625	≤ 0,0313 - 0,125	≤ 0,0313	0,0625	≤ 0,0313 - 0,0625
	Amphotericin B	1	1	0,5 - 1	0,5	1	0,125 - 1
<i>C. parapsilosis</i>	Fluconazol	1	16	0,5 - ≥ 128	2	2	1 - 2
	Itraconazol	0,125	16	≤ 0,0313 - ≥ 16	0,125	0,125	0,125
	Voriconazol	≤ 0,0313	0,5	≤ 0,0313 - ≥ 16	≤ 0,0313	0,0625	≤ 0,0313 - 0,0625
	5-Flucytosin	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	2	≤ 0,125 - 2
	Caspofungin	0,25	0,5	0,125 - 1	0,5	0,5	0,25 - 0,5
	Amphotericin B	1	1	0,5 - 1	0,5	0,5	0,5
<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	1	128	≤ 0,25 - ≥ 128	4	16	1 - 16
	Itraconazol	0,125	0,5	≤ 0,0313 - 1	0,125	1	0,125 - 1
	Voriconazol	0,125	16	≤ 0,0313 - ≥ 16	0,125	1	0,0625 - 1
	5-Flucytosin	16	64	≤ 0,125 - ≥ 64	≤ 0,125	32	≤ 0,125 - 32
	Caspofungin	0,0625	0,125	≤ 0,0313 - 0,125	≤ 0,0313	≤ 0,0313	≤ 0,0313
	Amphotericin B	1	1	0,125 - 1	0,5	1	0,5 - 1
andere	Fluconazol	4	8	≤ 0,25 - 8			
	Itraconazol	0,125	0,25	0,0625 - 0,25			
	Voriconazol	0,0625	0,5	≤ 0,0313 - 0,5			
	5-Flucytosin	2	64	≤ 0,125 - ≥ 64			
	Caspofungin	0,125	16	≤ 0,0313 - ≥ 16			
	Amphotericin B	0,5	1	0,25 - 1			

Tabelle 4.9: Zusammenfassung der Testergebnisse in Bezug auf die einzelne Antimykotika. Angabe von MHK_{50/90} und dem Konzentrationsbereich der MHKs in µg/ml. Angabe der Rate sensibler (S), dosisabhängig sensibler (S-DD) und resistenter (R) Ergebnisse in Prozent und in der Anzahl der Isolate (Nr.) für die Antimykotika (wegen der fehlenden „breakpoints“ nicht für Caspofungin). Aufteilung der Ergebnisse in deutsche (D) und österreichische (A) Isolate.

Antimykotikum	Land	MHK ₅₀	MHK ₉₀	Bereich der MHKs	% (Nr.) der Isolate		
					S	S-DD	R
Fluconazol	D	0,5	4	≤ 0,25 - ≥ 128	94,6%(141)	2,0%(3)	3,4%(5)
	A	1	4	≤ 0,25 - 16	97,4%(76)	2,6%(2)	0%(0)
Itraconazol	D	0,0625	0,5	≤ 0,0313 - ≥ 16	81,9%(122)	12,1%(18)	6,0%(9)
	A	0,0625	0,5	≤ 0,0313 - 1	84,6%(66)	11,5%(9)	3,8%(3)
Voriconazol	D	0,0625	0,5	≤ 0,0313 - ≥ 16	96,6%(144)	0,7%(1)	2,7%(4)
	A	≤ 0,0313	0,25	≤ 0,0313 - 1	100%(78)	0%(0)	0%(0)
5-Fluorcytosin	D	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125 - 32	91,3%(136)	1,3%(2)	7,4%(11)
	A	≤ 0,125	0,5	≤ 0,125 - ≥ 64	97,4%(76)	0%(0)	2,6%(2)
Caspofungin	D	≤ 0,0313	0,0625	≤ 0,0313 - 0,5			
	A	≤ 0,0313	0,125	≤ 0,0313 - ≥ 16			
Amphotericin B	D	0,5	0,5	0,125 - 1	100%(149)	/	0%(0)
	A	0,5	1	0,125 - 1	100%(78)	/	0%(0)

5. Diskussion

In den letzten zwanzig Jahren hat die Inzidenz von systemischen Pilzinfektionen kontinuierlich zugenommen (Pfaller und Diekema 2007). Bis in die 90er Jahre existierten großflächige Studien zur Epidemiologie und Resistenzlage systemischer *Candida*-Infektionen fast ausschließlich für die USA (Kao et al. 1999, Nguyen et al. 1996, Rangel-Frausto et al. 1999). Schon in diesen Studien fielen große Abweichungen der epidemiologischen Daten und auch der Resistenzraten zwischen den einzelnen geographischen Regionen auf.

Im Rahmen der ECMM-Studie von September 1997 bis Dezember 1999 wurden für die Staaten Westeuropas epidemiologische und klinische Daten von insgesamt 2.089 Episoden systemischer *Candida*-Infektionen erhoben. Für Deutschland und Österreich war das die erste nationale, prospektive, sequentielle und auf Krankenhauspopulationen basierende Datenerhebung überhaupt (Bernhardt et al. 2000). In meiner Arbeit wurden die erhobenen Daten hinsichtlich der Epidemiologie, Speziesverteilung und Risikofaktoren genau ausgewertet sowie die Blutkulturisolate gegen die sechs gängigen Antimykotika getestet. Damit wurde ein wichtiger Ausgangsstatus der *Candida*-Epidemiologie für Deutschland und Österreich erarbeitet. Das Nationale Referenzzentrum für Systemische Mykosen, in Göttingen, etablierte im Jahr 2004 deutschlandweit das Labornetzwerk MykolabNet-D. Mit dessen Hilfe wurden seit Juli 2004 Pilzisolat aus primär sterilen Materialien gesammelt und im Rahmen einer nationalen Kontrollstudie ausgewertet (Borg-von Zepelin et al. 2007). Diese Arbeit dient dem NRZSM als Grundlage zur Erkennung von epidemiologischen Trends und Resistenzentwicklungen in *Candida*-Spezies in Deutschland.

Systemische *Candida*-Infektionen stellen für viele Patientengruppen eine große Gefahr dar. Nach diesen Ergebnissen sind Infektionen häufig mit dem Aufenthalt auf Intensivstationen (52,9%) und mit großen chirurgischen Eingriffen (47,6%) assoziiert. Diese Zahlen liegen leicht über dem westeuropäischen Durchschnitt von 48,2% und 40,2% (Tortorano et al. 2004). In den USA ist die Rate von Candidämien bei Intensivpatienten mit etwa 35% jedoch deutlich niedriger (Hajjeh et al. 2004) und Candidämien nach chirurgischen Eingriffen werden sogar bei nur 18,5% der Patienten beschrieben (Kao et al. 1999). Der erhöhte Prozentsatz dieser Patientengruppen, der aus den deutschen und österreichischen Daten

hervorgeht, kann vielleicht damit erklärt werden, dass der überwiegende Teil der Isolate aus Universitätskliniken (Tabelle 2.1) stammt, in denen der prozentuale Anteil an Intensivpatienten und Patienten nach großen chirurgischen Interventionen größer ist als in kleineren, ländlichen Krankenhäusern (ähnliche Daten aus Krankenhäusern der Maximalversorgung bei McMullan et al. 2002, Schelenz und Gransden 2002, Yapar et al. 2005).

Auffällig war, dass bei 80,2% der Patienten vor Beginn der Candidämie ein zentraler Katheter in einer Vene oder Arterie platziert war. Diese Daten korrelieren gut mit ähnlichen Zahlen aus der Schweiz (80%), den USA (78%), England und Wales (76,1%), Finnland (81%) und Australien (76%) (Garbino et al. 2002, Hajjeh et al. 2004, Kibbler et al. 2003, Poikonen et al. 2003, Stratov et al. 1998). Die von Levin et al. 1998 postulierte Assoziation von *C. parapsilosis* mit Katheterinfektionen, aufgrund von vermehrter Schleimproduktion und besserer Adhärenz an synthetischen Oberflächen, konnte aus diesen Daten, mit Einschränkungen, bestätigt werden. Die Rate von Katheterinfektionen mit *C. parapsilosis* betrug 87,5%, während die nicht-*C. parapsilosis*-Isolate nur zu 76,8% mit Katheterinfektionen assoziiert waren. Das umgehende Entfernen zentraler Gefäßkatheter bei Diagnose einer Candidämie wird, soweit möglich, dringlich empfohlen (Pappas et al. 2004), da es zu einer deutlichen Senkung der Mortalität beitragen soll (Kibbler et al. 2003). Das Ergebnis meiner Auswertungen bestätigte die hohe Assoziationsrate von zentralen Gefäßkathetern mit systemischen *Candida*-Infektionen und zeigt damit noch einmal wie wichtig die umgehende Sanierung dieser Eintrittspforten ist.

Der Anteil der Patienten, der im Vorfeld der Candidämie mindestens ein Antibiotikum erhalten hatte lag in Deutschland bei 71% und in Österreich bei 87%. Daten aus der Schweiz (69%), England und Wales (77%), London (74%), Australien (95%) und der Türkei (76,9%) bestätigen diese hohen Zahlen (Garbino et al. 2002, Kibbler et al. 2003, Schelenz und Gransden 2002, Stratov et al. 1998, Yapar et al. 2005).

Eine weitere Risikogruppe waren mit 24,7% Patienten mit einer onkologischen Grunderkrankung. Diese Rate lag gut 10% unter dem westeuropäischen Durchschnitt (34,8%) (Tortorano et al. 2004), korrelierte aber gut mit den Daten aus einem Londoner Universitätsklinikum (24%) (Schelenz und Gransden 2002).

Die Rate an HIV-infizierten Patienten lag bei 1,9% und war damit im internationalen Vergleich (Spanien 4,4%, Italien 6%, USA 8-10%) eher gering (Almirante et al. 2005, Tortorano et al. 2001a, Hajjeh et al. 2004, Kao et al. 1999). Frühgeburtlichkeit war ein weiterer seltener Risikofaktor. Die erhöhte Rate von *C. parapsilosis* unter Candidämien bei Frühgeborenen (Almirante et al. 2005, Hajjeh et al. 2004, Kao et al. 1999, Rangel-Frausto et al. 1999, Tortorano et al. 2001b) ließ sich nicht bestätigen. 91,7% der Blutinfektionen bei Frühgeborenen wurden durch *C. albicans* und nur 8,3% durch *C. parapsilosis* ausgelöst, was mit Daten einer Studie aus der Slowakei korreliert (Krcmery und Kovacicova 2000). Allerdings kann bei den wenigen Isolaten, die Frühgeburtlichkeit als Risikofaktor aufwiesen, keine sichere Aussage hinsichtlich der Speziesverteilung getroffen werden.

Die Geschlechterverteilung in dieser Studie lag bei 127:89 Männern zu Frauen. Dieses bestätigt das häufigere Auftreten von Candidämien in Männern, was bis jetzt in den meisten Studien festgestellt wurde (Diekema et al. 2002, Kao et al. 1999, Richet et al. 2002, Sandven et al. 2006, Tortorano et al. 2004, Yapar et al. 2005).

Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 52,8 Jahren, wobei die deutschen Patienten mit im Schnitt 55,0 Jahren älter waren als die österreichischen Patienten mit im Schnitt 48,6 Jahren. Das Durchschnittsalter in anderen europäischen Studien lag für Irland bei 53,7 Jahren (Boo et al. 2005), in der Schweiz höher bei 61 Jahren (Garbino et al. 2002), in England und Wales bei 49,5 Jahren (Kibbler et al. 2003), in Finnland bei 59 Jahren (Poikonen et al. 2003) und in der Türkei bei 50,6 Jahren (Yapar et al. 2005). Korrelierend mit den Altersdaten der anderen westeuropäischen Länder (Tortorano et al. 2004), waren 31,7% aller Patienten ≥ 65 Jahre und 6,2% ≤ 1 Jahr alt.

In Bezug auf die Speziesverteilung überwog der Anteil an *C. albicans*-Isolaten in allen Altersklassen deutlich. Für die nicht-*C. albicans*-Spezies ließ sich der vielfach beschriebene Trend bestätigen, nach dem *C. glabrata*- und *C. tropicalis*-Candidämien vor allem ältere Patienten betrafen (Arendrup et al. 2005, Boo et al. 2005, Diekema et al. 2002, Pfaller et al. 2002a, Schelenz und Gransden 2003) während *C. parapsilosis*-Candidämien eher in jüngeren Patienten zu finden waren (Abb. 5.1). Das Durchschnittsalter von Patienten mit *C. glabrata*- und *C. tropicalis*-

Candidämien lag mit rund 62 Jahren deutlich über und das von Patienten mit *C. parapsilosis*-Candidämien mit 41,4 Jahren deutlich unter dem Durchschnittsalter von 52,8 Jahren. 25% der *C. parapsilosis*-Infektionen traten bei Patienten unter 16 Jahren, ähnlich einer Studie von Levy et al. (1998) und weitere 43,8% bei jüngeren Erwachsenen bis zum 50. Lebensjahr auf, ähnlich einer Studie von Boo et al. (2005). Die detaillierte Analyse und eine bildliche Darstellung dieser Daten ist in Kapitel 4.2.4 und Abbildung 4.9 zu finden.

Die altersunabhängige Auswertung der Daten in Bezug auf die Speziesverteilung der *Candida*-Isolate aus den Blutkulturen zeigen, dass sie mit den zur gleichen Zeit erhobenen Candidämie-Daten anderer europäischer Länder vergleichbar sind (Tortorano et al. 2004). Weltweit wurden bisher 17 verschiedene *Candida*-Spezies isoliert (Pfaller und Diekema 2004), wobei *Candida albicans* in den meisten Ländern immer noch den größten Anteil hatte. In den letzten Jahren wurde jedoch eine deutliche Abnahme von *C. albicans* zugunsten von nicht-*C. albicans*-Spezies beobachtet (Pfaller und Diekema 2007, Trick et al. 2002). Laut der von der ECMM erhobenen Daten lag Österreich mit einem *C. albicans*-Anteil von 75,6% etwas über dem damaligen weltweiten Durchschnitt von 71,6% (Pfaller et al. 2005), während Deutschland mit 62,4% deutlich darunter lag. Im westeuropäischen Vergleich der Daten der ECMM-Studie lagen beide Länder über dem Durchschnitt von 56,4% und im oberen Abschnitt der Bandbreite der *C. albicans*-Anteile von 42,7% bis 67,0% (deutsche und österreichische Daten wurden nicht getrennt ausgewertet) (Tortorano et al. 2004).

C. glabrata war in Deutschland und Österreich die zweithäufigste Spezies und machte 15,4% bzw. 10,3% aller Isolate aus. Diese Daten liegen nah am westeuropäischen Durchschnitt von 13,6% (Tortorano et al. 2004) und korrelieren mit Ergebnissen aus Island (12,4%), der Schweiz (17%), England und Wales (16,2%) und Schweden (15,7%) (Ásmundsdóttir et al. 2002, Garbino et al. 2002, Kibbler et al. 2003, Klingspor et al. 2004). Allerdings zeigen Studien aus Osteuropa und Lateinamerika eine deutlich niedrigere Prävalenz dieser Spezies von 4% (Colombo et al. 1999, Krcmery und Kovacicova 2000, Yapar et al. 2005). In den USA, Kanada und einigen europäischen Ländern ist *C. glabrata* jedoch die Spezies mit der in den letzten Jahrzehnten am schnellsten steigenden Prävalenzrate (McMullan et al. 2002, Trick et al. 2002, Pfaller et al. 2001). Dieser Trend lässt sich auch für Deutschland bestätigen: die multizentrische PEG-Studie

(1983-1985) ergab einen *C. glabrata*-Anteil von 10% (Dermoumi 1987), in der ECMM-Studie (1997-1999) lag der Anteil schon bei 15,4% und in einer aktuellen Veröffentlichung des NRZSM (2004-2005) erreichte er 19,1% (Borg-von Zepelin et al. 2007). Der Spezies *C. glabrata* wird eine steigende Resistenzrate gegenüber den weit verbreiteten Triazol-Antimykotika, insbesondere Fluconazol und Itraconazol, zugeschrieben (Pfaller und Diekema 2007, Pfaller et al. 2002b, Cuenca-Estrella et al. 2002, Hajjeh et al. 2004). Dieser Trend spielt eine große Rolle für die zukünftige Behandlung von älteren Patienten mit *C. glabrata*-Candidämien (Pfaller und Diekema 2002, Rex et al. 2000) und muss durch aktuelle Studien überwacht werden.

Candida tropicalis und *Candida parapsilosis* standen bei der Speziesverteilung mit 9,7% und 7,0% an dritter und vierter Stelle. Die länderspezifische Verteilung war 11,4% und 7,4% für Deutschland und jeweils 6,4% für Österreich. Die ECMM-Daten der meisten anderen westeuropäischen Länder, sowie Studien aus den USA, Kanada und Lateinamerika zeigten hingegen einen deutlich höheren Anteil von *C. parapsilosis* (7% bis 39%) und einen niedrigeren Anteil an *C. tropicalis* (2% bis 10%) (Cuenca-Estrella et al. 2002, Pfaller et al. 2000 und 2001, Tortorano et al. 2004). Diese Sonderstellung vor allem der Speziesverteilung unter den deutschen Isolaten wurde jedoch durch die Studie von Dermoumi (1987) bestätigt, in der sehr ähnliche Anteile von 12% *C. tropicalis* und 9% *C. parapsilosis* festgestellt wurden.

Im Hinblick auf die Verteilung der selteneren Spezies fällt das Fehlen von *C. krusei*-Isolaten auf. Diese Spezies wies in den USA, der Schweiz, Kanada, Westeuropa und Norwegen eine Prävalenz von ca. 2% auf (Hajjeh et al. 2004, Marchetti et al. 2004, Pfaller et al. 2001, Tortorano et al. 2004, Sandven 2000) und erreichte in einigen Ländern wie der Slowakei und Finnland 5,8% bzw. sogar 8% (Krcmery und Kovacicova 2000, Poikonen et al. 2003). In Studien, die ausschließlich hämatoonkologische Patienten untersuchten, waren die Anteile an *C. krusei*-Isolaten noch einmal deutlich höher bei 10% bis 27% (Antoniadou et al. 2003, Nawrot et al. 2005, Slavin und die Australian Mycology Interest Group 2002). Die aktuelle Studie des nationalen Referenzzentrums für Mykosen bestätigte eine mit 1,4% im nationalen Vergleich niedrige Rate an *C. krusei*-Isolaten für den Raum Deutschland (Borg-von Zepelin et al. 2007).

Auf der Basis jahrzehntelanger weltweiter Forschung nach einer geeigneten, universell einsetzbaren Methode zur Resistenztestung von Hefen (Rex et al. 1993, Schmalreck und Fegeler 1996) gab die CLSI 1997 die standardisierte Anleitung M27-A heraus (National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997 und 2002). Die Ergebnisse der Resistenztestungen nach dieser Mikrodilutionsmethode zeigten eine gute Reproduzierbarkeit im Vergleich zwischen einzelnen Laboratorien und bei wiederholter Testung (Odds et al. 2004). Das ist für die sichere Beurteilbarkeit klinischer Hefeisolate auf ihr Resistenzverhalten gegenüber gängigen Antimykotika unverzichtbar. Die von der CLSI publizierte Referenzmethode ist jedoch in Bezug auf Ablesegenauigkeit, Schnelligkeit und mögliche Automatisierung bzw. Vereinfachung einzelner Arbeitsschritte noch nicht vollends ausgereift. Es gibt einige Studien zur Verbesserungen der Referenzmethode und Studien über Vergleiche mit möglichen, industriell vorgefertigten Schnelltests (Barry et al. 2000, Bartizal und Odds 2003, Cuenca-Estrella und Rodriguez-Tudela 2001, Cuenca-Estrella et al. 2001, Davey et al. 1998, Matar et al. 2003, Pai und Jones 2004, Pfaller et al. 2003 und 2004c, Rex et al. 2001). Das Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (AFST-EUCAST) publizierte eine Standardmethode für die Resistenztestung basierend auf der Referenzmethode des CLSI (Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases 1999, Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing 2002). Auch bei dieser Methode liegen Studien über eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse vor (Cuenca-Estrella et al. 2002). Vergleiche beider Methoden wurden von Cuenca-Estrella et al. (2003) und Espinel-Ingroff et al. (2005) durchgeführt.

Um die Mikrodilutionsmethode in Ihren Laboratorien etablieren zu können, haben viele Arbeitsgruppen die Referenzmethode M27-A der CLSI mit Änderungen nach EUCAST durchgeführt. So konnte durch eine höhere Glucosekonzentration von 2% im RPMI-Medium in vielen Studien eine Verkürzung der Inkubationszeit von 48 auf 24 Stunden erreicht werden (Almirante et al. 2005, Cuenca-Estrella et al. 2001 und 2005, Davey et al. 1998, Nguyen und Yu 1999, Odds et al. 2004, Pai und Jones 2004, Pfaller et al. 2004b, Rex et al. 2001). Bei der Etablierung des

Tests in unserem Labor wurde die Verkürzung der Inkubationszeit ebenfalls angestrebt und verschiedene Glucosekonzentrationen zwischen 0,2% und 2% im RPMI-Medium getestet. Es zeigte sich, dass eine Verdoppelung der Glucosekonzentration von 0,2% auf 0,4% schon ausreichte, um den gewünschten Effekt zu erzielen.

Die Herstellung des Inokulums wurde nach den Leitlinien der CLSI mit einer Einsaat von $1,0$ bis $5,0 \times 10^3$ Zellen/ml durchgeführt. Die vom EUCAST beschriebene Erhöhung der Einsaat auf $0,5$ bis $2,5 \times 10^5$ (Cuenca-Estrella et al. 2001, 2002 und 2005) führte in unseren Testungen, vor allem bei den Azolen, aufgrund des daraus resultierenden durchgängigen Wachstums der Hefepilze bis in hohe Antimykotikakonzentrationen (siehe 4.1.1), zu Ungenauigkeiten bei der MHK-Bestimmung.

Um das Ablesen der Mikrottestplatten genauer und personenunabhängiger zu machen wurde anstelle des vom CLSI vorgeschlagenen makroskopischen Ablesens mit dem bloßen Auge die in den EUCAST-Publikationen beschriebene Bestimmung des Trübungswertes durch die Messung der optischen Dichte der einzelnen Positionen in einem Mikrottestplatten-Photometer durchgeführt. Auch diese Abwandlung der Referenzmethode wurde schon in einigen Studien zur Resistenztestung angewandt (Arendrup et al. 2005, Cuenca-Estrella et al. 2001, 2002 und 2005, Hajjeh et al. 2004, Odds et al. 2004, Pai und Jones 2004). Außerdem wurden Flachboden-Mikrottestplatten verwendet, da in den Vortestungen kein Einfluss auf die Ergebnisse im Vergleich zu Rundboden-Mikrottestplatten nachgewiesen werden konnte (siehe 4.1.4) (Rambali et al. 2001). Die Platten wurden nach der makroskopischen Kontrolle vor der spektrophotometrischen Trübungsmessung manuell durchmischt, um eine homogene Trübung zu erzeugen und Luftbläschen in den Positionen zu eliminieren (Barchiesi et al. 1994, Espinel-Ingroff et al. 2005, Rex et al. 2001).

Die Resistenztestung der 227 ECCM-Isolate mit der in der Arbeitsgruppe neu etablierten Mikrodilutionsmethode erbrachte folgende Ergebnisse: 5,4% der deutschen und 2,6% der österreichischen Isolate zeigten ein vermindertes Ansprechen auf Fluconazol. Diese niedrigen Resistenzraten und die uneingeschränkte Sensibilität der *C. albicans*-Isolate bestätigen damit die in vielen Studien beschriebene, anhaltende, gute Wirksamkeit des am weitesten

verbreiteten systemischen Antimykotikums, auch nach einem mehr als zehn Jahre langen Gebrauch als systemisches Antimykotikum für Deutschland und Österreich (Almirante et al. 2005, Ásmundsdóttir et al. 2002, Borg-von Zepelin et al. 2007, Cuenca-Estrella et al. 2005, Diekema et al. 2002, Fleck et al. 2007, Kibbler et al. 2003, Hajjeh et al. 2004, Pfaller und Diekema 2002, Pfaller et al. 2001, 2002a und 2004a, Sanglard und Odds 2002, Tortorano et al. 2003 und 2005).

Trotz dieser guten Sensibilitätsraten zeichnete sich eine erhöhte Fluconazol-Resistenz bei der Spezies *C. tropicalis* ab (18% vermindertes Ansprechen). Dieses Ergebnis muss jedoch aufgrund der geringen Anzahl der Isolate der Spezies *C. tropicalis* mit Vorsicht interpretiert werden. Das in der Literatur beschriebene vermehrte Vorkommen dieser Spezies und die hohe Resistenzrate im internationalen Vergleich (0% bis 7%) (Pfaller und Diekema 2002 und 2007) scheint jedoch auf eine Besonderheit in Deutschland und Österreich hinzuweisen und sollte in folgenden Studien beobachtet werden.

13% der *C. glabrata*-Isolate zeigten eine eingeschränkte Sensibilität auf Fluconazol. Das korrelierte gut mit Daten aus Barcelona (Almirante et al. 2005), war jedoch im internationalen Vergleich (7% bis 40%) (Pfaller und Diekema 2002 und 2007) eine eher geringe Rate, zumal dieser Spezies eine intrinsische Resistenz gegen Azole zugeschrieben wird (Miyazaki et al. 1998, Ostrosky-Zeichner et al. 2003, Pfaller et al. 2001, 2002b, Sanglard und Odds 2002, Sanglard et al. 1999).

Für Itraconazol konnte die Testung die in der Literatur postulierte höchste Resistenzrate von allen getesteten Antimykotika bestätigen, wobei gegen die Isolate der Spezies *C. albicans* eine gute Wirksamkeit mit weiterhin niedrigen MHKs nachgewiesen werden konnte (Pfaller et al. 2002a).

Bei den nicht-*C. albicans*-Spezies reichten die Resistenzraten von ca. 10% bei den Isolaten der Spezies *C. parapsilosis*, über ca. 30% bei den Isolaten der Spezies *C. tropicalis* bis zu 87% bei den Isolaten der Spezies *C. glabrata*. Die Gesamtheit der Isolate hatte eine Sensibilitätsrate von ca. 83%, was gut mit Daten aus Island (87%) und Spanien (78% bis 87%) korreliert (Ásmundsdóttir et al. 2002, Cuenca-Estrella et al. 2002 und 2005).

Die MHK_{90} aller Isolate lag bei 0,5µg/ml, was im dosisabhängig sensiblen Bereich liegt. Unter klinischen Gesichtspunkten ist das jedoch eine

Itraconazolkonzentration, die im Serum und im Plasma von Patienten durchaus im therapeutischen Bereich liegt (Glasmacher et al. 1999). Daher ist der andauernde klinische Einsatz von Itraconazol als potentes Antimykotikum gerechtfertigt. Die in der Literatur festgelegten „Breakpoints“ für Itraconazol sollten jedoch kritisch hinterfragt werden.

Im letzten Jahr publizierten Pfaller et al. (2006b) Resistenzgrenzen für Voriconazol. Die kritische Analyse der MHKs unter diesem neuen Triazol ergaben sehr niedrige Resistenzraten und sensible Ergebnisse bei den meisten Isolaten, die gegen Fluconazol und Itraconazol Resistenzen aufgewiesen hatten. Insgesamt lag die Resistenzrate mit knapp 2% im Rahmen der von Pfaller et al. (2001) publizierten globalen Daten. Es gab nur vier resistente und einen dosisabhängig sensiblen Stamm. Diese nicht-*C. albicans*-Isolate waren jedoch auch hochgradig resistent gegenüber Fluconazol und Itraconazol, so dass hier von kreuzresistenten Isolaten ausgegangen werden muss.

Alle Azole hemmen die CYP450-abhängige Demethylierung von Lanosterol zu Ergosterol, das wichtigste Sterol in der Zellmembran der meisten Pilze. Dies führt zu einer veränderten Zellmembranfunktion und damit zur Hemmung von Zellwachstum und Zellteilung. Voriconazol ist eine Weiterentwicklung des Fluconazols und hat ein erweitertes Wirkungsspektrum, das zum Beispiel *Aspergillus spp.* und *Fusarium spp.* einschließt. Resistenzen können zum Beispiel durch eine Änderung der Sterolkomposition oder durch die Änderung anderer Enzyme der Ergosterol-Biosynthese entstehen.

Die Beobachtungen von erhöhten Resistenzraten von Voriconazol gegenüber *C. glabrata*-Isolaten zwischen 4,1% im asiatisch-pazifischen Raum, um 5,5% in Europa und Lateinamerika und sogar 9% in Nordamerika (Pfaller und Diekema 2007, Table 12) ließen sich mit einer Resistenzrate von unter 1% für die getesteten *C. glabrata*-Isolate nicht bestätigen.

Die in der Literatur beschriebene gute Wirksamkeit von Amphotericin B gegen *Candida*-Spezies wurde durch meine Testungen bestätigt, da die Isolate Speziesübergreifend eine MHK $\leq 1\mu\text{g/ml}$ (MHK_{50/90} 0,5 $\mu\text{g/ml}$ / 1 $\mu\text{g/ml}$) zeigten (Almirante et al. 2005, Arendrup et al. 2005, Ásmundsdóttir et al. 2002, Cuenca-Estrella et al. 2002 und 2005, Diekema et al. 2002, Kibbler et al. 2003, Nawrot et al. 2005, Pfaller et al. 2002a, Tortorano et al. 2003). Trends, wie von Hajjeh et al. (2004) und Pfaller et al. (2004b) beschrieben, die auf eine Resistenzentwicklung bei *C.*

glabrata und anderen nicht-*C. albicans*-Spezies hinweisen könnten, wurden nicht beobachtet. Insgesamt zeigte die Mikrodilutionstestung gegenüber Amphotericin B Spezies- und Länder-übergreifend nur MHKs einer geringen Bandbreite im Bereich von 0,125µg/ml bis 1µg/ml. In der Literatur existieren einige Studien, die eine bessere Detektion von Amphotericin-B-resistenten Stämmen durch den E-Test beschreiben (Pfaller et al. 1998).

Für 5-Fluorcytosin publizierte Pfaller et al. (2002c) eine Studie mit den Resistenzdaten von 8.803 weltweit gesammelten *Candida*-Isolaten. 95% der Isolate wurden sensibel, 2% intermediär und 3% resistent getestet und die MHK_{90} lag bei 1µg/ml im sensiblen Konzentrationsbereich, so dass die Wirksamkeit von 5-Fluorcytosin als gut eingestuft werden konnte. Von Quindós et al. (2004) publizierte Resistenzdaten von 1.021 spanischen *Candida*-Isolaten zeigten eine weniger gute Wirksamkeit von 5-Fluorcytosin (83,4% sensibel, 6,2% intermediär, 10,4% resistent). Ähnliche Resistenzdaten wurden auch von Cuenca-Estrella et al. (2002), Diekema et al. (2002) und Tortorano et al. (2003) veröffentlicht. Außerdem wurde in diesen Studien eine Wirkminderung von 5-Fluorcytosin gegenüber einigen Isolaten der Spezies *C. tropicalis* (7,1% bis 30% Resistenz) beschrieben.

Unsere Daten ergaben 91,3% sensible, 1,3% intermediäre und 7,4% resistente Isolate für Deutschland sowie 97,4% sensible und 3,6% resistente Isolate für Österreich. Die Spezies *C. albicans*, *C. parapsilosis* und *C. glabrata* reagierten größtenteils sensibel auf 5-Fluorcytosin. Die Resistenzrate der Spezies *C. tropicalis* war entsprechend der oben zitierten Studien erhöht, mit 41,2% sensibilitätsgeminderten deutschen und 20% sensibilitätsgeminderten österreichischen Isolaten.

Wie zu erwarten gab es in Bezug auf Mehrfachresistenzen mit den Azolen für diese *C. tropicalis*-Isolate keine Hinweise. Die acht gegen 5-Fluorcytosin resistent getesteten Isolate waren ausnahmslos sensibel gegenüber Fluconazol und Voriconazol. Anders war dies bei einem der zwei resistent getesteten *C. glabrata*-Isolate. Dieser Stamm war zusätzlich hoch resistent gegenüber Fluconazol, Voriconazol und Itraconazol, reagierte jedoch sensibel auf Amphotericin B und seine MHK für Caspofungin lag bei einer niedrigen Konzentration von 0,0625µg/ml, so dass von einer Sensibilität gegenüber Echinocandinen ausgegangen werden kann.

Für Caspofungin existieren bis heute noch keine Beurteilungsgrenzen („breakpoints“). Die MHK_{90} war mit $0,125\mu\text{g/ml}$ für die deutschen Isolate und mit $0,0625\mu\text{g/ml}$ für die österreichischen Isolate niedrig und 99% der Isolate hatte eine $MHK \leq 1\mu\text{g/ml}$, was die gute Wirksamkeit von Caspofungin gegen *Candida*-Spezies in anderen Studien bestätigt (Arendrup et al. 2005, Cuenca-Estrella et al. 2005, Pfaller und Diekema 2007, Pfaller et al. 2004b und 2006a). Nur ein Stamm der Spezies *C. guilliermondii* zeigte eine deutlich erhöhte MHK von $\geq 16\mu\text{g/ml}$ und konnte als resistent eingestuft werden. Im Serum und Plasma von Patienten wurden in einer klinischen Studie Basiskonzentrationen von $\geq 1\mu\text{g/ml}$ und Spitzenkonzentrationen von bis zu $10\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen (Dodds et al. 2006). Aufgrund dieser Daten kann von einer guten Wirksamkeit von Caspofungin gegenüber 99% der für diese Arbeit getesteten Stämme in vivo ausgegangen werden.

Abschließend betrachtet stellen systemische Infektionen mit *Candida*-Spezies ein nicht zu unterschätzendes Problem im klinischen Alltag dar. Besonders Patienten mit schwerwiegenden Grunderkrankungen sind gefährdet und die Mortalitätsrate von systemischen Pilzinfektionen ist trotz der inzwischen vorhandenen guten Behandlungsmöglichkeiten mit besser verträglichen, systemisch wirksamen Antimykotika hoch. Die in meiner Arbeit ausgewerteten Daten und Isolate wurden von September 1997 bis Dezember 1999 im Rahmen der ECMM-Studie zusammengetragen. Ihre Auswertung und Verarbeitung zeigt für diesen Zeitraum eine günstige Resistenzlage der *Candida*-Isolate im deutsch-österreichischen Raum. Fluconazol ist als gängigstes Antimykotikum Spezies-übergreifend gut wirksam und bei resistenten Isolaten kann sicher auf Amphotericin B oder neue Präparate wie Vorikonazol und Caspofungin zurückgegriffen werden. Einzig bei der Behandlung von *C. glabrata*- und *C. tropicalis*-Septikämien mit Itraconazol und 5-Fluorcytosin muss mit Wirkschwächen gerechnet werden.

Meine Arbeit liefert eine wichtige Grundlage für die weitere *Candidämie*-Forschung in Deutschland und Österreich. Wie die Ergebnisse zeigen, müssen in den kommenden Jahren die Trends in Bezug auf das Spektrum der *Candida*-Spezies und die Resistenzentwicklung von Isolaten deutscher Kliniken genau beobachtet werden, um rechtzeitig klinische Therapiekonzepte optimieren zu können. Dazu muss die Resistenztestung von klinischen Blutkulturisolaten für Deutschland zentralisiert durchgeführt und die Epidemiologie und

Resistenzentwicklung in Studien überwacht werden. Diese Aufgabe wurde durch das seit 2004 bestehende Nationale Referenzzentrum für Systemische Mykosen, in Göttingen, mit Unterstützung des nationalen Labornetzwerk MykolabNet-D übernommen. Die durch diese Arbeit etablierte Mikrodilutionsmethode M27-A2 der CLSI zur Resistenztestung von Hefen sollte in Zukunft noch weiter vereinfacht und automatisiert werden, um möglichst schnell und sicher reproduzierbare Ergebnisse liefern zu können. Außerdem sollten in internationalen Vergleichsstudien die geographischen Besonderheiten der einzelnen Länder identifiziert werden, da ggf. angepasste Therapiekonzepte für einzelne Regionen oder bestimmtes Patientengut entwickelt werden müssen.

6. Zusammenfassung

Systemische Pilzinfektionen haben in den letzten Jahren deutlich an Umfang und Bedeutung zugenommen. Zudem hat sich in den letzten Jahren das Spektrum der vorhandenen Antimykotika erweitert, was in der Folge zu einer veränderten Resistenzsituation unter den Pilzen führen kann. In Deutschland existieren bis zum heutigen Zeitpunkt nur wenige Candida-Epidemiologie-Studien, die auch die Resistenzlage mit einbeziehen.

Ziel meiner Arbeit ist es

1. den von der CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002) festgelegten Standardtest zur Resistenztestung von Hefen für das NRZSM (Nationale Referenzzentrum für systemische Mykosen) zu etablieren. Hierzu mussten die grundsätzlichen Parameter dieses Tests wie Glucosekonzentrationen des Mediums, Quantitäten der Einsaat, unterschiedliche Mikrottestplatten im Einsatz, Inkubationszeiten sowie optische und photometrische Messtechniken zur Auswertung einzeln verglichen werden, um die Stärken und Grenzen des Tests klar einschätzen zu können.
2. die in den Jahren 1997 – 1999 erhobenen Daten aus der Studie der ECMM (European Confederation of Medical Mycology) (Kibbler et al. 2003, Tortorano et al. 2003, 2004 und 2006) aufzuarbeiten und die rekultivierten 227 Candida-Isolate aus Blutkulturen mit dem erarbeiteten Standardtest nach CLSI auf potenzielle Resistenzen gegen die folgenden Antimykotika Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Amphotericin B, 5-Fluorcytosin und Caspofungin zu testen.

Die Daten der Resistenztestung wurden zusammen mit den in der ECMM-Studie erhobenen epidemiologischen Daten ausgewertet. Alle Ergebnisse wurden für die Gesamtheit der Isolate und weiterhin im Vergleich für die deutschen und die österreichischen Isolate getrennt beurteilt.

Die Auswertung der epidemiologischen Daten ergab das folgende Spektrum an Spezies: *C. albicans* (67%), *C. glabrata* (13,7%), *C. tropicalis* (9,7%), *C. parapsilosis* (7,0%) und Isolate seltener Spezies (2,5%). Isolate der Spezies *C. krusei* wurden innerhalb dieser Studie nicht isoliert.

Meine Auswertung belegte, dass in verschiedenen Altersgruppen bestimmte nicht-*C. albicans*-Spezies dominieren. Außerdem zeigte sich eine deutliche

Korrelation von Candidämien mit klinischen Risikofaktoren, wie zentral-vaskuläre Katheter und Antibiotikatherapie.

Die Analyse der Resistenztests mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode erbrachte die folgenden Ergebnisse:

- (i) Fluconazol - 94,6% der deutschen und 97,4% der österreichischen Stämme waren sensibel. 3,4% der deutschen Isolate, jedoch kein österreichischer Stamm (0%) waren als resistent einzustufen.
- (ii) Itraconazol - 81,9% der deutschen Stämme und 84,6% der österreichischen Isolate waren sensibel, bei einer Resistenzrate von 6% (deutsche Isolate) bzw. 3,8% (österreichische Isolate).
- (iii) Vorikonazol - 96,6% der deutschen und alle getesteten österreichischen Stämme (100%) waren sensibel. 2,7% aus der Gesamtheit der deutschen Isolate waren als resistent einzustufen.
- (iv) Amphotericin B - alle Stämme aus beiden Ländern waren zu 100% sensibel.
- (v) 5-Fluorcytosin - 91,36% der deutschen und 97,4% der österreichischen Stämme waren sensibel, während 7,4% der deutschen Isolate und 2,6% der österreichischen Isolate als resistent einzustufen waren.
- (vi) Caspofungin – hierfür existieren in der Literatur noch keine offiziellen „breakpoints“. Die Ergebnisse der Mikrodilutionstestung aller Isolate lagen im Bereich von $\leq 0,0313\mu\text{g/ml}$ und $0,5\mu\text{g/ml}$. Nur ein Stamm der Spezies *C. guilliermondii* wurde mit einer MHK von $\geq 16\mu\text{g/ml}$ getestet.

Zusammenfassend ist die Resistenzsituation dieser getesteten Isolate aus den Jahren 1997 bis 1999 innerhalb von Deutschland und Österreich als günstig einzustufen.

Die hier erhobenen Daten bilden die Basis, um Resistenzentwicklungen von Candida-Isolaten der nachfolgenden Jahre beurteilen und in der Schwere einschätzen zu können.

7. Literaturverzeichnis

Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M (2005): Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol **43**: 1829-1835

Antonidau A, Torres HA, Lewis RE, Thornby J, Bodey GP, Tarrand JP, Han XY, Rolston KV, Safdar A, Raad II, Kontoyiannis DP (2003): Candidemia in a tertiary care cancer center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. Medicine **82**: 309-312

Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgen B, Schonheyden JC, Tvede M (2005): Semination surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and number of isolates with reduced azole susceptibility. J Clin Microbiol **43**: 4434-4440

Ásmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Gottfredsson M (2002): Increasing Incidence of Candidemia: Results from a 20-Year Nationwide Study in Iceland. J Clin Microbiol **40**: 3489-3492

Baran J Jr, Muckatira B, Khatib R (2001): Candidemia before and during the fluconazole era: prevalence, type of species and approach to treatment in a tertiary care community hospital. Scand J Infect Dis **33**: 137-139

Barchiesi F, Colombo AL, McGough DA, Rinaldi MG (1994): Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for in-vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards' proposed standard. J Clin Microbiol **32**: 2494-2500

Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Knapp C, Renne RP, Rex JH, Rinaldi MG (2000): Quality Control Limits for Broth Microdilution Susceptibility Tests of Ten Antifungal Agents. J Clin Microbiol **38**: 3457-3459

Bartizal C, Odds FC (2003): Influence of Methodological Variables on Susceptibility Testing of Caspofungin against *Candida* Species and *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2100-2107

Bernhardt H, Zimmermann K, Sissolak D, Schutt-Gerwitt H, Schroder G, Enzensberger R, Willinger B, Weig M, Berns G, Grisold A (2000): Epidemiological survey on candidemia in Europe: results of Germany and Austria. *Rev Iberoam Micol* **17 (Suppl. 3)**: 146-147

Boo TW, O'Reilly B, O'Leary J, Cryan B (2005): Candidaemia in an Irish tertiary referral hospital: epidemiology and prognostic factors. *Mycoses* **48**: 251-259

Borg-von Zepelin M, Eiffert H, Kann M, Rüchel R (1993): Changes in the spectrum of fungal isolates: results from clinical specimens gathered in 1987/88 compared with those in 1991/92 in the University Hospital Göttingen, Germany. *Mycoses* **36**: 247-253

Borg-von Zepelin M, Kunz L, Rüchel R, Reichard U, Weig M, Groß U (2007): Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother* **60**: 424-428

Colombo AL, Nucci M, Salomao R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, Wey SB (1999): High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* **34**: 281-286

Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL (2001): Present status of the detection of antifungal resistance: the perspective from both sides of the ocean. *Clin Microbiol Infect* **7 (Suppl. 2)**: 46-53

Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL (2001): Influence of Glucose Supplementation and Inoculum Size on Growth Kinetics and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* **39**: 525-532

Cuenca-Estrella M, Rodero L, García-Effrón G, Rodriguez-Tudela JL (2002): Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. J Antimicrob Chemother **49**: 981-987

Cuenca Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Dupont B, Rex JH (2003): Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). Clin Microbiol Infect **9**: 467-474

Cuenca-Estrella M, Rodriguez D, Almirante B, Morgan J, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M (2005): In *vitro* susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002-2003 J Antimicrob Chemother **55**: 194-199

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**: 917-921

Davey KG, Szekely A, Johnson EM, Warnock DW (1998): Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standart method for in-vitro susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. J Antimicrob Chemother **42**: 439-444

Dermoumi H (1987): Pilze als Sepsiserreger – Ergebnisse einer multizentrischen Studie. Mykosen **30**: 349-354

Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, Pfaller MA (2002): Epidemiology of Candidemia: 3-Year Results from the Emerging Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms Study. J Clin Microbiol **40**: 1298-1302

Dodds AES, Lewis R, Lewis JS, Martin J, Andes D (2006): Pharmacology of systemic antifungal agents. Clin Infect Dis **43 (Suppl. 1)**: 28-39

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**: 239-244

Espinell-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**: 3884-3889

Fleck R, Dietz A, Hof H (2007): In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. J Antimicrob Chemother **59**: 767-771

Garbino J, Kolarova L, Rohner P, Lew D, Pichna P, Pittet D (2002): Secular Trends of Candidemia Over 12 Years in Adult Patients at a Tertiary Care Hospital. Medicine **81**: 425-433

Geffers C, Zuschneid I, Sohr D, Rüden H, Gastmeier (2004): Microbiological Isolates Associated with Nosocomial Infections in Intensive Care Units: Data of 274 Intensive Care Units Participating in the German Nosocomial Infections Surveillance System (KISS). Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther **39**: 15-19

Glasmacher A, Hahn C, Molitor E, Marklein G, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG (1999): Itraconazole trough concentrations in antifungal prophylaxis with six different dosing regimens using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin oral solution or coated-pellet capsules. Mycoses **42**: 591-600

Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA (2004): incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and in Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998-2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. J Clin Microbiol **42**: 1519-1527

Jarvis WR (1995): Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. Clin Infect Dis **20**: 1526-1530

Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS, Baughman WS, Reingold AL, Rothrock G, Pfaller MA (1999): The Epidemiology of Candidemia in Two United States Cities: Results of a Population-Based Active Surveillance. Clin Infect Dis **29**: 1164-1170

Kibbler CC, Seaton S, Barnes RA, Gransden WR, Holliman RE, Johnson EM, Perry JD, Sullivan DJ, Wilson JA (2003): Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. J Hosp Infect **54**: 18-24

Klingspor L, Tornqvist E, Johansson A, Petrini B, Forsum U, Hedin G (2004): A prospective epidemiological survey of candidaemia in Sweden. Scand J Infect Dis **36**: 52-55

Knoke M, Schulz K, Bernhardt H (1997): Dynamics of *Candida* isolations from humans from 1992-1995 in Greifswald, Germany. Mycoses **40**: 105-110

Krcmery V Jr, Kovacicova G (2000): Longitudinal 10-year prospective survey of fungaemia in Slovak Republik: trends in etiology in 310 episodes. Slovak Fungaemia study group. Diagn Microbiol Infect Dis **36**: 7-11

Levin AS, Costa SF, Mussi NS, Basso M, Sinto SI, Machado C, Geiger DC, Villares MC, Schreiber AZ, Barone AA, Branchini ML (1998): *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semiimplantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn Microbiol Infect Dis* **30**: 243-249

Levy I, Rubin LG, Vashishtha S, Tucci V, Sood SK (1998): Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin Infect Dis* **26**: 1086-1088

Lyytikäinen O, Lumio J, Sarkkinen H, Kolho E, Kostiala A, Ruutu P, Hospital Infection Surveillance Team (2002): Nosocomial Bloodstream Infections in Finnish Hospitals during 1999-2000. *Clin Infect Dis* **35**: e14-e19

Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Täuber MG, Pittet D (2004): Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis* **38**: 311-320

Martin D, Persat F, Piens MA, Picot S (2005): *Candida* species distribution in bloodstream cultures in Lyon, France, 1998-2001. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**: 329-333

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**: 1647-1651

McMullan R, McClurg R, Xu J, Moore JE, Millar BC, Crowe M, Hedderwick S (2002): Trends in the Epidemiology of *Candida* Bloodstream Infections in Northern Ireland between January 1984 and December 2000. *J Infect* **45**: 25-28

Miyakazi H, Miyakazi Y, Geber A, Parkinson T, Hitchcock C, Falconer DJ, Ward DJ, Marsden K, Bennett JE (1998): Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, *pdh1*, in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1695-1701

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard M27-A. NCCLS, Wayne/PA **1997**

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard M27-A Second Edition. NCCLS, Wayne/PA **2002**

Nawrot U, Nowicka J, Juszczak K, Gusin B (2005): Susceptibility to antifungal agents of *Candida* species isolated from paediatric and adult patients with haematological diseases. *Mycoses* **48**: 385-390

Nguyen MH, Yu CY (1999): Influence of incubation time, inoculum size and glucose concentrations on spectrophotometric endpoint determinations for amphotericin B, fluconazole, and itraconazole. *J Clin Microbiol* **37**: 141-145

Nguyen MH, Peacock JE Jr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL (1996): The changing face of candidemia: Emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* **100**: 617-623

Odds FC, Motyl M, Andrade R, Bille J, Cantón E, Cuenca-Estrella M, Davidson A, Durussel C, Ellis D, Foraker E (2004): Interlaboratory Comparison of Results of Susceptibility Testing with Caspofungin against *Candida* and *Aspergillus* Species. *J Clin Microbiol* **42**: 3475-3482

Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kauffmann CA, Cleary J (2003): Antifungal susceptibility survey of 2.000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3149-3154

Pai MP, Jones AL (2004): Altered Susceptibility of *Candida glabrata* Bloodstream Isolates to Triazoles at Clinically Relevant pH Values: Comparison of the NCCLS M27-A2, Sensitire YeastOne and Etest Methods. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4441-4443

Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE (2004): Guidelines for Treatment of Candidiasis. *Clin Infect Dis* **38**: 161-189

Pfaller MA, Diekema DJ (2002): Role of Sentinel Surveillance of Candidemia: Trends in Species Distribution and Antifungal Susceptibility. *J Clin Microbiol* **40**: 3551-3557

Pfaller MA, Diekema DJ (2004): Rare and emerging opportunistic fungal pathogens concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* **42**: 4419-4431

Pfaller MA, Diekema DJ (2007): Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163

Pfaller MA, Messer SA, Bolmström A (1998): Evaluation of Etest for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis* **32**: 223-227

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ, SENTRY Participant Group (2000): Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997 – 1998. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 747-751

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA, The Sentry Participant Group (2001): International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazol, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J Clin Microbiol **39**: 3254-3259

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ, SENTRY Participants Group (2002a): Trends in Antifungal Susceptibility of *Candida* spp. Isolated from Pediatric and Adult Patients with Bloodstream Infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. J Clin Microbiol **40**: 852-856

Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Diekema DJ (2002b): In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6.970 clinical isolates of *Candida* spp. Antimicrob Agents Chemother **46**: 1723-1727

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Huynh RJ, Hollis RJ, Diekema DJ (2002c): 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**: 3518-3521

Pfaller MA, Diekema DJ, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ (2003): Evaluation of the Etest and Disk Diffusion Methods for Determining Susceptibilities of 235 Bloodstream Isolates of *Candida glabrata* to Fluconazole and Voriconazole. J Clin Microbiol **41**: 1875-1880

Pfaller MA, Diekema DJ, International Fungal Surveillance Participant Group (2004a): Twelve Years of Fluconazole in Clinical Practice: Global Trends in Species Distribution and Fluconazole Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida*. Clin Microbiol Infect **10**: 11-23

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ (2004b): Geographic Variation in the Susceptibilities of Invasive Isolates of *Candida glabrata* to Seven Systemically Active Antifungal Agents: a Global Assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program Conducted in 2001 and 2002. J Clin Microbiol **42**: 3142-3146

Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Jones RN (2004c): Clinical Evaluation of the Sensitire YeastOne Colorimetric Antifungal Plate for Antifungal Susceptibility Testing of the New Triazoles Voriconazole, Posaconazole and Ravuconazole. J Clin Microbiol **42**: 4577-4580

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 diskdiffusion testing. J Clin Microbiol **43**: 5848-5859

Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ (2006a): In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. J Clin Microbiol **44**: 760-763

Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, Chaturvedi V, Ghannoum M, Odds FC, Rinaldi MG (2006b): Correlation of MIC with Outcome for *Candida* Species Tested against Voriconazole: Analysis and Proposal for Interpretive Breakpoints. J Clin Microbiol **44**: 819-826

Poikonen E, Lyytikäinen O, Anttila VJ, Ruutu P (2003): Candidemia in Finland, 1995-1999. Emerg Infect Dis **9**: 985-990

Quindós G, Ruesga MT, Martín-Mazuelos E, Salesa R, Alonso-Vargas R, Carrillo-Muñoz AJ, Brena S, San Millán R, Pontón J (2004): In-vitro activity of 5-fluorocytosine against 1,021 Spanish clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts. Rev Iberoam Micol **21**: 63-69

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**: 163-177

Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, Pfaller MA, Edwards Jr JE, Jarvis W, Dawson J (1999): National Epidemiology of Mycoses Survey (NEMIS): Variations in Rates of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species in Seven Surgical Intensive Care Units and Six Neonatal Intensive Care Units. *Clin Infect Dis* **29**: 253-258

Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN (1993): Antifungal Susceptibility Testing. *Clin Microbiol Rev* **6**: 367-381

Rex JH, Walsh TJ, Sobel SD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, Edwards JE (2000): Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* **30**: 662-678

Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ (2001): Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenger. *Clin Microbiol Rev* **14**: 643-658

Richet H, Roux P, Des Champs C, Esnault Y, Andreumont A (2002): Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol Infect* **8**: 405-412

Rüchel R, Kellner S, Schaffrinski M (2002): Renewed increase in *Candida albicans* among yeast isolates from the Göttingen university hospital. *Mycoses* **45**: 109-110

Sandven P (2000): Epidemiology of Candidemia. *Rev Iberoam Micol* **17**: 73-81

Sandven P, Bevanager L, Digranes A, Haukland HH, Mannsaker T, Gausted P, Norwegian Yeast Study Group (2006): Candidemia in Norway, 1991 to 2003: results from a nationwide study. J Clin Microbiol **44**: 1977-1981

Sanglard D, Odds FC (2002): Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2002; **2**:73-85

Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk PA, Bille J (1999): The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother **43**: 2753-2765

Schelenz S, Gransden WR (2002): Candidaemia in a London teaching hospital: analysis of 128 cases over a 7-year period. Mycoses **46**: 390-396

Schmalreck AF, Fegeler W (1996): Criteria for a microdilution susceptibility testing method of fluconazole: proposal of a standardized testing method for yeasts. Mycoses **39 (Suppl. 2)**: 12-16

Schwesinger G, Junghans D, Schröder G, Bernhardt H, Knoke M (2005): Candidosis and aspergillosis as autopsy findings from 1994 to 2003. Mycoses **48**: 176-180

Slavin MA, Australian Mycology Interest Group (2002): The epidemiology of candidemia and Mould infections in Australia. J Antimicrob Chemother **49 (Suppl. 1)**: 3-6

Stratov I, Gottlieb T, Bradbury R, O'Kane GM (1998): Candidaemia in an Australian teaching hospital: relationship to central line and TPN use. J Infect **36**: 203-207

Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Method for determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by Broth Dilution of fermentative species of yeasts. EUCAST, Berlin **1999**

Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing: *Method for Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by Broth Dilution of Fermentative Yeast*, discussion document **E.Dis7.1**. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen **2002**

Tortorano AM, Peman J, Faure O, Bernhardt H, Kibbler CC, Grillot R (**2001a**): Bloodstream infections due to *Candida* species in AIDS patients: report of 63 episodes from the European Confederation of Medical Mycology (ECMM). Clin Infect Dis **33**: 1219

Tortorano AM, Peman J, Klingspor L, Bernhardt H, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Ainscough S (**2001b**): Candidemia in premature neonates. Report of 123 episodes from the ECMM working group. Mycoses **44 Suppl. 1**): 76

Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, Prigitano A, Viviani MA (**2003**): The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-*albicans Candida* isolates from blood. J Antimicrob Chemother **52**: 679-682

Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S (**2004**): Epidemiology of Candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **23**: 317-322

Tortorano AM, Prigitano A, Biraghi E, Viviani MA (2005): The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: in vitro susceptibility of 375 *Candida albicans* isolates and biofilm production. J Antimicrob Chemother **56**: 777-779

Tortorano AM, Kibbler CC, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R (2006): Candidaemia in Europe: Epidemiology and Resistance. Int J Antimicrob Agents **27**: 359-366

Trick WE, Fridkin JR, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP, National Nosocomial Infections 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**: 627-630

Wenzel RP, Edmond MB (2001): The Impact of Hospital-Acquired Bloodstream Infections. Emerg Infect Dis **7**: 174-177

Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP (1988): Hospital-Acquired Candidemia: the Attributable Mortality and Excess Length of Stay. Arch Intern Med **148**: 2642-2645

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**: 309-317

Yapar N, Uysal U, Yucesoy M, Cakir N, Yuce A (2005): Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* Species in a Turkish University Hospital. Mycoses **49**: 134-138

Danksagung

Frau Prof. Dr. med. M. Borg-von Zepelin danke ich für das Ermöglichen dieser Arbeit, die Vergabe des Themas sowie die freundliche, intensive und persönliche Betreuung.

Luisa Kunz danke ich für unsere unvergessliche gemeinsame Zeit, die beste Teamarbeit und die besondere, unerschütterliche Freundschaft, die daraus geworden ist.

Für die Korrekturarbeiten möchte ich meinen Eltern, meinem Freund Hinnerk und Herrn Dr. Stubenrauch danken.

Lebenslauf

Ich wurde am 26. August 1980 in Göttingen geboren.

Die ersten Jahre lebte ich mit meinen Eltern, dem Bahnbeamten Helmut Kumm und der technischen Zeichnerin Christina Kumm, in Lerbach im Harz. Nach der Geburt meiner Schwester, Nina Kumm, zogen wir nach Seesen.

Dort verbrachte ich meine Kindheit und besuchte von 1987 bis 1993 die Grundschule und Orientierungsstufe des Schulzentrums. Im Herbst 1993 wurde ich in die siebte Klasse des Jacobson Gymnasiums, Seesen versetzt.

Während des elften Schuljahres (1997 bis 1998) nahm ich mit einem Stipendium des Parlamentarischen Patenschaftsprogramms an einem Schüleraustausch mit den USA teil. Ich besuchte dort die zwölfte Klasse der High School in Linden, Michigan und schloss diese mit dem High School Diploma ab.

Im Sommer 2000 absolvierte ich das Abitur am Jacobson Gymnasium Seesen mit Auszeichnung.

Das Studium der Humanmedizin begann ich im Wintersemester 2000/2001 an der Medizinischen Hochschule Hannover. Nach dem bestandenen ersten Staatsexamen zog ich im Sommer 2003 mit meinem Lebenspartner, Hinnerk Eilers, nach Göttingen. Zum Wintersemester 2003/2004 setzte ich das Studium an der Georg-August-Universität Göttingen fort.

Im April 2005 begann ich mit der Laborarbeit für die vorliegende Dissertation in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Borg- von Zepelin, Abteilung Medizinische Mikrobiologie (Prof. Dr. med. U. Groß) im Zentrum Hygiene und Humangenetik in Göttingen.

Im Mai 2007 schloss ich das Studium nach bestandendem 3. Staatsexamen ab und erhielt meine Approbation als Ärztin.

Seit Oktober 2007 befinde ich mich in der Facharztausbildung zur Allgemeinärztin und bin im Krankenhaus Duderstadt als Assistenzärztin in der Abteilung der Inneren Medizin tätig.