

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters -

EINFLUSS DER KOMBINATION VON FLUCYTOSIN UND FLUCONAZOL AUF
DIE EMPFINDLICHKEIT VON CANDIDA TROPICALIS-ISOLATEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von:
Gemmeke, Astrid
aus Warburg
2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Fegeler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. W. Mathys

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters –

Referent: Prof. Dr. med. W. Fegeler
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. W. Mathys

Z u s a m m e n f a s s u n g

Einfluss der Kombination von Flucytosin und Fluconazol auf die Empfindlichkeit von *Candida tropicalis*-Isolaten Astrid Gemmeke

Von 273 unselektionierten *Candida (C.) tropicalis*-Isolaten der mykologischen Routinediagnostik wurde mittels Breakpointtest die „Minimale Hemmkonzentration“ (MHK) gegen die Antimykotika Flucytosin (FCY), Fluconazol (FLC) und Voriconazol (VOR) ermittelt und analysiert. Von den 273 *C. tropicalis*-Isolaten (100 %) erwiesen sich nach 48 h gegen FCY 55,3 %, FLC 81 % und VOR nach CLSI-Breakpoints 71,4 % als sensibel. Für FCY zeigte sich nach 48 h eine bimodale Empfindlichkeitsverteilung. Eine relevante inkubationszeitabhängige Empfindlichkeitsveränderung im Breakpointtest trat bei FCY in 0,4 %, bei FLC in 6,6 % und bei VOR in 20,9 % der Isolate auf. Ein Ausschluss von Stämmen für eine erweiterte Empfindlichkeitsbestimmung sollte daher frühestens nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden erfolgen.

In Hinsicht auf eine Kombinationstherapie von FLC und FCY waren im Kreuztitrationstest von 29 gegenüber einem oder beiden Antimykotika resistenten *C. tropicalis*-Stämmen Isolate mit der qualitativen Fractional Inhibitory (FIC)-Index-Bewertung „Antagonismus“ (in RPMI siebenmal, in YST-Medium viermal) vorhanden. Die MHK-Werte der Kombinationstestung wiesen jedoch alle diese Isolate als sensibel bzw. intermediär sensibel aus. Von einem klinisch relevanten Antagonismus ist daher nicht auszugehen. Ein additiver / synergistischer Effekt fand sich nach 48 Stunden in RPMI bei 6 / 11 und in YST-Medium bei 6 / 15 der 29 Isolate.

Die in vitro-Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf die erweiterten Therapiemöglichkeiten mit der Kombination von Flucytosin und Fluconazol hin. Gleichzeitig zeigen sie aber auch, dass das qualitative Ergebnis „Antagonismus“ des FIC-Index an der Einstufung der entsprechenden MHK-Werte auf seine klinische Bedeutung zu hinterfragen ist.

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	1
2	Literatur	3
2.1	Systematik und Epidemiologie der Pilzkrankungen	3
2.1.1	Einteilung der Pilze	3
2.1.2	Sproßpilze der Gattung <i>Candida</i>	5
2.2	Pathogenese und Prädispositionsfaktoren.....	8
2.2.1	Pathogenese	8
2.2.2	Prädispositionsfaktoren	10
2.3	Klinische Bilder der Candidosen	13
2.3.1	Lokalinfektionen	13
2.3.2	Tiefe Candidosen.....	14
2.4	Diagnostik der Candidosen	16
2.5	Therapie der tiefen Candidosen	18
2.5.1	Allgemeine Behandlungsformen.....	18
2.5.2	Spezifische Behandlungsformen	19
2.5.3	Kombinationstherapie.....	24
2.5.4	Epidemiologie der in-vitro-Resistenzen der Gattung <i>Candida</i> gegenüber den Antimykotika Flucytosin und Fluconazol.....	27
3	Material und Methode.....	31
3.1	Material	31
3.1.1	Hefestämme	31
3.1.2	Nährmedien.....	33
3.1.3	Antimykotika	35
3.1.4	Mikrotiterplatten	36
3.1.5	Photometer	36
3.2	Methode.....	37
3.2.1	Erstellung des Inokulums	37
3.2.2	Breakpoint-Testung (Untersuchungsphase 1)	40
3.2.3	Inkubation und Ablesung	41
3.2.4	Kreuztitrationstestung (Untersuchungsphase 2)	41
3.2.5	Methoden der Auswertung	44
3.2.5.1	S-I-R-Klassifikation	44
3.2.5.2	A-B-C-Klassifizierung	45
3.2.6	Fractional Inhibitory Concentration-Index (FIC-Index)	46
4	Ergebnisse der eigenen Untersuchungen.....	48
4.1	Ergebnisse des Breakpoint – Tests (BPT)	48
4.1.1	Verteilung der MHK im Breakpoint-Test nach 24 und 48 Stunden in der A-B-C-Klassifizierung der <i>C. tropicalis</i> - Isolate	48
4.1.2	Zeitabhängige Veränderungen der Verteilung der MHK innerhalb der Empfindlichkeitsklasse A.....	50
4.1.3	Breakpoint-Testergebnisse der 14 Kontrollstämmen.....	52
4.1.4	Formen und Häufigkeitsverteilung der inkubationszeitabhängigen Empfindlichkeitsänderungen	54
4.1.5	Vergleichende Auswertungen der Empfindlichkeiten	55

4.1.5.1	Empfindlichkeitsmuster–Analyse der Kontrollstämmе	56
4.1.5.2	Häufigkeit von Übereinstimmungen, Parallel– und Kreuzresistenzen bei den 273 <i>C. tropicalis</i> –Isolaten	58
4.2	Ergebnisse der Kreuztitration (Checkerboard–Testung)	60
4.2.1	Resistenzmuster auf der Basis der A–B–C–Klassifizierung.....	60
4.2.2	Analyse der Empfindlichkeiten bei den 29 Isolaten des Kontrollkollektives	62
4.2.3	Vergleich der MHK–Werte in den unterschiedlichen Medien	64
4.2.4	Empfindlichkeitsverteilung MHK–Werte der 29 <i>C. tropicalis</i> – Isolate in der Kreuztitration (KT) für die einzelnen Antimykotika	65
4.2.5	Vergleich der MHK–Ergebnisse und der KT–MHK– Ergebnisse in Abhängigkeit von Medium und Inkubationszeit	68
4.2.6	Fractional Inhibitory Concentration–Index (FIC–Index)	71
4.2.6.1	Verteilung des Fractional Inhibitory Concentration und der FIC–Indices bei den Kontrollstämmen	71
4.2.6.2	Verteilung des Fractional Inhibitory Concentration und der FIC–Indices der 29 <i>Candida tropicalis</i> –Isolate.....	74
4.2.6.3	Verteilung der Isolate auf die vier qualitativen FIC–Index– Gruppen und ihre zeitlichen Veränderungen	81
4.2.6.4	Bewertung der Isolate mit einem qualitativen antagonistischen FIC–Index aus klinisch–therapeutischer Sicht.....	82
5	Diskussion	84
6	Zusammenfassung.....	97
7	Literaturverzeichnis	99
8	Danksagung	128
9	Lebenslauf	129

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

System- und / oder Organmykosen stellen in der Regel sekundäre nosokomiale Komplikationen bei Patienten mit erkrankungs- und therapiebedingten Prädispositionen dar und sind in Abhängigkeit von der Grunderkrankung, der Prädisposition des Patienten sowie der Art des Erregers mit einer Letalität von 30 % bis zu 100 % verbunden. Dabei nimmt zum Beispiel durch die Erfolge der Medizin im Bereich der Tumor- und Transplantationschirurgie, aber auch durch die modernen und zunehmend erfolgreichen Therapiestrategien in der Hämatonkologie nicht nur die Zahl der hochprädisponierten Patienten, sondern auch unter anderem dadurch bedingt die Zahl der Systemmykosen zu. So stellen Hefen der Gattung *Candida* heute in manchen Bereichen die vierthäufigsten Erreger nosokomialer Septikämien dar (BANERJEE 1991, BECK-SAGUE 1993, BORG-VON ZEPELIN 2007, FLECK 2007).

Zunehmend spielen jedoch auch andere pathogene Hefen als *Candida (C.) albicans* eine Rolle als Erreger von systemischen Mykosen, wobei *C. tropicalis* aufgrund ihrer teilweise schlechten Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen Antimykotika mit einer Letalität von > 50 % im Verlauf einer Candidämie verbunden ist (ALMIRANTE 2005).

Die teils unbefriedigende Empfindlichkeitssituation bei *C. tropicalis* wirft in Anlehnung an eine erfolgreiche Kombinationstherapie mit den Antimykotika Amphotericin B und Flucytosin die Frage auf, ob eine Kombination von Flucytosin mit dem Triazolantimykotikum Fluconazol, welches sich durch eine geringere Nebenwirkungsrate und eine günstige Pharmakokinetik auszeichnet, eine therapeutische Alternative wäre.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, im ersten Schritt die Empfindlichkeitsverteilung von *C. tropicalis*-Isolaten der mykologischen Routinediagnostik gegenüber Flucytosin, Fluconazol und Voriconazol mittels eines Suchtestes (Breakpointtest) zu ermitteln und zu analysieren. Mit Hinsicht

auf eine Kombinationstherapie von Flucytosin und Fluconazol sollen dann anhand von Isolaten mit einer verminderten Empfindlichkeit die Empfindlichkeitsveränderungen mittels Kreuztitrationsverfahren beim gleichzeitigen Einsatz beider Antimykotika in vitro modellhaft evaluiert und analysiert werden.

2 Literatur

2.1 Systematik und Epidemiologie der Pilzkrankungen

2.1.1 Einteilung der Pilze

Pilze sind heterotrophe Eukaryonten, die auf oder in organischem Material leben. Nach der botanischen Taxonomie gehören die Pilze in das Reich der Mycota oder Fungi. Sie sind durch eine große morphologische Variabilität und eine hohe Artenvielfalt bestimmt (SEELIGER 1988).

Allerdings wird nur 270 der etwa 200000 heute bekannten Pilzspezies eine Humanpathogenität zugeschrieben (PERFECT 1996). Aus klinischer Sicht ist eine nur nach taxonomischen Gesichtspunkten ausgerichtete Klassifikation nicht praktikabel. Denn unterschiedliche Erkrankungen können durch dieselbe Pilzart ausgelöst sein, und ähnliche Krankheitsbilder können durch unterschiedliche Pilzspezies hervorgerufen werden. Daher hat sich eine klinische Unterteilung nach Spross- und Fadenpilzen bewährt, bei der die Fadenpilze wiederum nach ihrer unterschiedlichen Affinität zum Gewebe in Dermatophyten und Schimmelpilze unterteilt werden. Das sogenannte D(Dermatophyten)–H(Hefen)–S(Schimmelpilze)–System wurde 1965 durch RIETH eingeführt (Tabelle 2.1).

Morphologisch werden Sprosspilze (Blastomyzeten) und Fadenpilze (Hyphomyzeten) unterschieden. Die Fadenpilze bestehen aus fadenartigen Zellen, den sogenannten Hyphen. Sie können Septen besitzen oder auch unseptiert sein. Ein Geflecht aus mehreren Hyphen wird Myzel genannt. Im Myzel entstehen die Fortpflanzungselemente, die Sporen. Hefezellen vermehren sich durch Zellsprossung, dabei entsteht an einer oder mehreren Stellen der Zelle, dies ist art- und gattungsabhängig, eine Öffnung, durch die umgeben von einer „Membran“ Zytoplasma, Kerne und Zellorganellen austreten und so eine Tochterzelle bilden. Da die Öffnung gleich bleibt, die Tochterzelle aber wächst, entsteht zwischen Mutter- und Tochterzelle die für die Zellsprossung charakteristische Einziehung. Löst sich die Tochterzelle nicht von

der Mutterzelle und entwickelt ein Längenwachstum, kommt es zur Ausbildung eines Pseudomycel.

Als dimorphe Pilze bezeichnet man Organismen, die in Abhängigkeit von den vorherrschenden Milieubedingungen entweder die Sprosspilz- oder die Fadenpilzform ausprägen.

Bewährt hat sich zudem eine Einteilung der durch Pilze verursachten Erkrankungsformen des Menschen (Tabelle 2.2). Die größte medizinische Bedeutung erhalten dabei die Mykosen.

Tabelle 2.1 Einteilung der humanpathogenen Pilze im D–H–S–System nach RIETH

Gruppe	<u>D</u>ermatophyten	<u>H</u>efen	<u>S</u>chimmelpilze	Sonstige Pilze
Gattungen	<i>Trichophyton</i>	<i>Candida</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Blastomyces</i>
	<i>Mikrosporum</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Mucor</i>	<i>Histoplasma</i>
	<i>Epidermophyton</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Coccidioides</i>
	<i>Keratinomyces</i>	<i>Malassezia</i>	<i>Scopulariopsis</i>	<i>Paracoccidioides</i>
	u.a.	<i>Rhodotorula</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Sporothrix</i>
		u.a.	u.a.	u.a.

Tabelle 2.2 Formen der Pilzerkrankungen

Myzetismus	Vergiftung durch den Genuss giftiger Pilze
Mykotoxikosen	Erkrankungen nach Genuss von Lebensmitteln, die mit Pilztoxinen verunreinigt sind
Mykoallergosen	Allergische Krankheitsbilder, bei denen Pilzsporen, andere Pilzbestandteile oder Stoffwechselprodukte der Pilze das auslösende Allergen darstellen
Mykosen	Erkrankungen durch Pilze als Parasiten im lebenden Gewebe

2.1.2 Sproßpilze der Gattung *Candida*

Neben den Schimmelpilzen gewinnen vor allem die Hefen an klinischer Bedeutung. Hefen, deren Bezeichnung vom mittelhochdeutschen Wort „heffe“ = heben stammt, sind eine sehr heterogene Gruppe von verschiedenen Pilztaxa. Gemeinsam haben sie die Vermehrung durch Sprossung. Hefen werden aufgrund ihrer sexuellen Vermehrung in die drei Gruppen der Ascomycetes, der Heterobasidiomycetes und der Deuteromycetes eingeteilt. Die Ascomycetes vermehren sich sexuell durch die Bildung von Ascosporen, welche von zwei konjugierten diploiden Zellen oder von einer Mutterzelle mit Knospe gebildet werden. Die Heterobasidiomycetes sind charakterisiert durch die Bildung von sexuellen Teliosporen und asexuellen Endosporen. Von den Deuteromycetes ist keine sexuelle Vermehrung bekannt. Deswegen werden sie auch Fungi imperfecti genannt.

Hervorgehoben werden sollte vor allem die weltweit vorkommende Gattung *Candida*. Von den mehr als 200 beschriebenen Arten gelten weniger als zehn Prozent als fakultativ pathogen, also als opportunistische Keime (WEDDING 1995). Ihre Differenzierung basiert im Wesentlichen auf Merkmalen der Mikromorphologie, der Makromorphologie, der Fermentation, der Assimilation von Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen, ihrer Wachstumsfähigkeit bei 37° C und serologischen Kriterien. Makroskopisch imponieren die *Candida*-Hefen mit bakterienähnlichem, cremefarbenem Kolonienwachstum auf festen Nährmedien. Die *Candida*-Arten können leicht im KOH- oder Methylenblau-Präparat mikroskopisch nachgewiesen werden. Die *Candida*-Spezies haben generell runde bis ovale vegetative Zellen, die sich durch Sprossung vermehren. Manchmal können sich Blastosporen verlängern und Pseudomycel bilden. *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* und *Candida kefyr* bilden im Gegensatz zu *Candida glabrata* ein typisches Pseudomycel aus.

Für *Candida albicans* existieren in der Literatur 172 Synonyma, und diese Hefe-Spezies stellt immer noch die am häufigsten aus klinischem Material isolierte Spezies dar. Hauptreservoir von *Candida albicans* sind Tiere und der Mensch selbst, bei dem der Erreger als Transientflora auf den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes und des Urogenitaltrakts vorkommen kann.

Andere Sprosspilze sind ubiquitär verbreitet. Seit Beginn der 1980er Jahre konnte *Candida tropicalis* mit einer Zunahme von 400 % als Sepsiserreger nachgewiesen werden (LU 2004) und ist weltweit damit die dritthäufigste *Candida*-Spezies, die im Blut von Sepsispatienten nachgewiesen werden kann (FLECK 2007). Bei *Candida tropicalis* ist die perfekte Form unbekannt und hat durch ihre oft höhere Virulenz und teils schlechtere antimykotische Empfindlichkeit als *Candida albicans*, vor allem bei geschwächten Patienten, an klinischer Bedeutung gewonnen (POLAK 2001, TAKAKURA 2004). *Candida tropicalis* verursacht vor allem bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen disseminierte Infektionen (HEIZMANN 1993). Der wiederholte Nachweis im

Trachealsekret oder Urin solcher Patienten, auch bei Frühgeborenen, sollte daher an eine Pilzsepsis denken lassen (CHOWDHARY 2003).

Die zunehmende Häufigkeit von Systemmykosen der Gattung *Candida*, aber auch bestimmter Formen oberflächlicher Candidosen, ist vor allem ein Problem jüngerer Zeit. Invasive Candidosen sind zumeist eine sekundäre nosokomiale Komplikation bei Patienten, die wegen einer schweren Grunderkrankung stationär behandelt werden. In den 1980er Jahren wurde eine Zunahme der invasiven Mykosen bei chirurgischen Patienten von 2,5 auf 5,6 Fälle pro 1000 Entlassungen beobachtet (BANERJEE 1991). In Deutschland wird die Inzidenz von Candidosen auf 45000 Fälle pro Jahr geschätzt (MÜLLER 1994). Hefen der Gattung *Candida* rückten vom achthäufigsten zum vierthäufigsten Erreger nosokomialer Septikämien auf und sind bei 8 % bis 15 % dieser Infektionen nachweisbar (BANERJEE 1991, BECK–SAGUE 1993, BORG–VON ZEPELIN 2007, FLECK 2007).

Mykosen durch den Erreger *Candida albicans* sind in der Vergangenheit mit einem Anteil von 70 % am häufigsten beobachtet worden. In den letzten Jahren wurde jedoch eine Verschiebung des Erregerspektrums zu *Candida–non–albicans*–Spezies wie *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* und *Candida lusitaniae* beschrieben (PFALLER 1988, RANDHAWA 2000, WRIGHT 1997). Inzwischen werden 60–70 % aller Candidämien von non-*C. albicans*–Stämmen verursacht (CUENCA–ESTRELLA 2002). Tiefe Infektionen durch diese gegenüber Antimykotika häufig resistenteren Arten sind durch eine besonders hohe Mortalität charakterisiert. Als ursächlich wird von einigen Autoren die Selektion resistenterer Hefearten durch zunehmende therapeutische und prophylaktische Anwendung von Antimykotika gesehen (CHRISTENSON 1987, WINGARD 1995).

In Studien konnte ebenfalls eine von der jeweiligen Grunderkrankung unabhängige Steigerung der Mortalität und eine Zunahme der Dauer der Krankenhausaufenthalte durch *Candida*–Mykosen gezeigt werden (WENZEL 1995, WEY 1988).

2.2 Pathogenese und Prädispositionsfaktoren

2.2.1 Pathogenese

Da *Candida*-Spezies ubiquitär vorkommen, kolonisieren sie auch beim gesunden Menschen als transiente Besiedlung die Haut, die Mundschleimhaut, den Gastrointestinaltrakt oder die Harnwege. Trotzdem gehören Hefen der Gattung *Candida* nicht zur Normalflora (FEGELER 1995).

Die klinische Signifikanz der Kolonisation mit Hefen der Gattung *Candida* wird seit Jahren kontrovers diskutiert. Die intestinale Kolonisation mit *Candida*-Arten kann eine Minderung der zellvermittelten Immunität bei kritisch kranken Patienten verursachen (MARSHALL 1988). Das Ausmaß der Besiedelung ist zudem bei kritisch kranken Patienten am höchsten (MITCHELL 1982). Sepsiszeichen mit peritonealer Kontamination und positiver Blutkultur war in einer Studie mit einer Mortalität von 83 % verbunden (SOLOMKIN 1982). Dagegen konnte je nach verwendeter Untersuchungstechnik bei gesunden Patienten *Candida albicans* in bis zu 71 % der Fälle in der Mundhöhle und bei bis zu 60 % aller untersuchten Personen im Stuhl nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich bei hospitalisierten Patienten eine höhere, von der Dauer des Krankenhausaufenthaltes abhängige Besiedlungsfrequenz als bei Gesunden (WEDDING 1995).

Medizinisches Personal kann bei der nosokomialen Infektion als Erregerreservoir bedeutsam sein, da in bis zu 75 % der Fälle eine Besiedlung der Hände durch Hefen der Gattung *Candida* gezeigt wurde (PFALLER 1995). Andere Autoren beobachteten eine Übertragung von *Candida*-Stämmen zwischen Patienten und medizinischem Personal bei *Candida albicans*, weniger oder nicht bei *Candida glabrata* und *Candida parapsilosis* (HEDDERICK 2000). In der Pathogenese der Candidose wird zwischen der endogenen und exogenen Entstehung unterschieden (COLE 1996, GIAMARELLOU 1996, WENZEL 1995). Exogene Infektionen erfolgen vor allem durch Verweilkatheter. Eine weitere Gefahr der exogenen *Candida*-Infektion ist bei Operationen vorhanden.

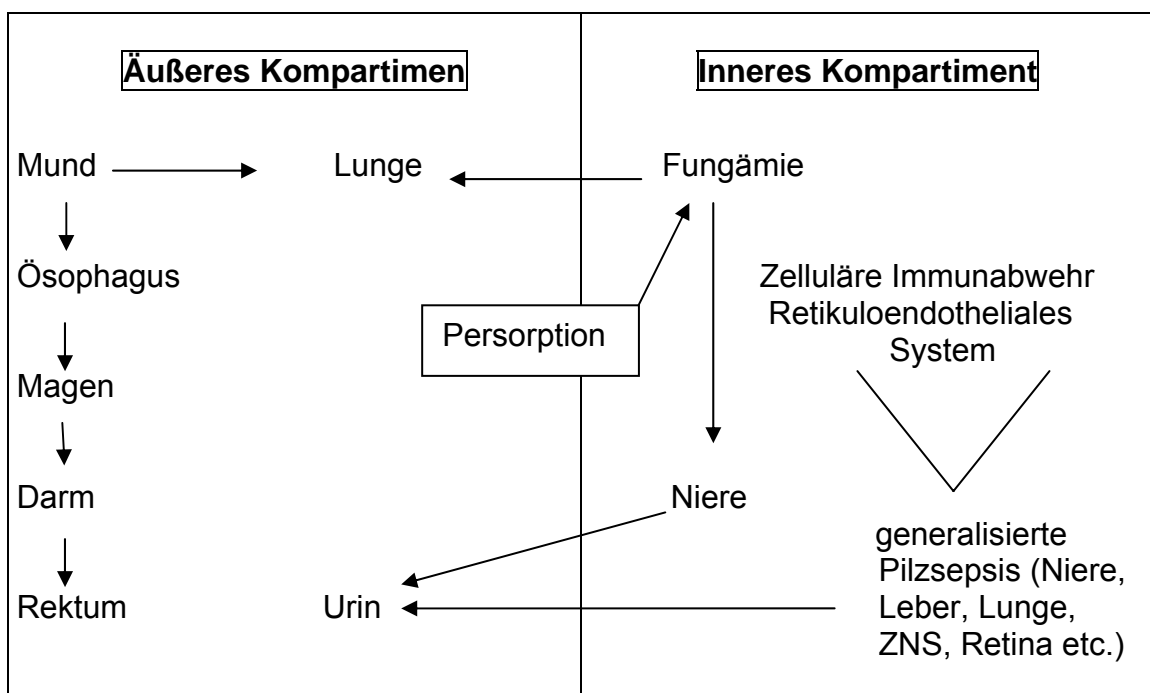
Häufiger als die exogene Infektionsentstehung ist jedoch der endogene Infektionsmodus, bei dem der Patient selbst die Ausgangsquelle für seine Mykose darstellt. Bei prädisponierten Patienten erfolgt nach Kolonisation der oralen Mundschleimhaut die weitere Ausbreitung in anderen Organen (Abbildung 2.1) (FEGELER 1986). Für die endogene Entstehungsweise ist zum einen die Quantität von Hefezellen im Darm bedeutungsvoll. Übersteigt die Keimzahl eine kritische Schwelle, so steigt die Wahrscheinlichkeit einer Persorption im Darmbereich, und Hefezellen gelangen in den Blutkreislauf. Dieses Phänomen wird auch als HERBST-Effekt bezeichnet. Bei Gesunden ist ein ausgeprägter Clearance-Mechanismus mit Phagozytose von Hefezellen in der Leber oder durch andere Organe feststellbar. Deshalb ist eine transitorische und asymptomatische Fungämie oder Fungiurie keineswegs mit einer Sepsis gleichzusetzen. Wird durch Abwehrschwäche dieser Clearance-Mechanismus herabgesetzt, steigt die Wahrscheinlichkeit stark an, dass die Hefen in das innere Kompartiment eindringen und eine tiefe Mykose mit Organabsiedlung und lebensbedrohlichen Komplikationen eines septischen Schockes oder Multiorganversagens auslösen können.

Pathogene Hefen der Gattung *Candida* können zudem an frisch verletzten Oberflächen adhären und epitheliale und subepitheliale Gewebe via Aktivierung von Phospholipasen und Proteinasen angreifen (CALDERONE 1989, DEITCH 1990, GHANNOUM 1990, INONE 1988).

Entscheidend für eine mögliche Infektion ist zum einen die Erregervirulenz, zum anderen die Stärke von Abwehrmechanismen des befallenen Organismus (PIZZO 1992). Die Möglichkeit mittels Adhäsinen an Rezeptoren der Wirtszellen zu adhären, der reversible Übergang von der einzelligen Hefenform zu filamentösen, vegetativen Formen (Pseudomyzel, bei *C. albicans* teilweise auch echtes Myzel), sezernierte Aspartyl-Proteasen und Phospholipasen, phänotypische Umstellungen mit Veränderungen der Antigenexpression und des Gewebetropismus wurden bei *Candida albicans* und anderen *Candida*-Spezies als Virulenzfaktoren identifiziert (CALDERONE 2001). Da *Candida*-Arten einerseits Gesunde transient ohne Krankheitssymptome besiedeln können, andererseits aber für eine Infektion eine Schwächung der Wirtsabwehr

notwendig ist, werden diese Erreger als „fakultative pathogene“ oder „opportunistische“ Erreger bezeichnet. Ein wiederholter Nachweis pathogener Hefen ohne klinische Symptome im gleichen Untersuchungsmaterial spricht hingegen für eine Kolonisation und sollte die Frage nach einer lokalen oder generalisierten Prädisposition aufwerfen.

Abbildung 2.1 Kompartiment–Modell der Pathogenese der Hefepilzsepsis nach FEGELER 1986



2.2.2 Prädispositionsfaktoren

Entscheidend für die Verhinderung einer mykotischen Infektion ist die Stärke bzw. die Beeinträchtigung der körpereigenen Abwehrmechanismen. Damit gehören zu den wesentlichen Prädispositionsfaktoren für die Entwicklung einer Pilzinfektion eine Beschädigung der Haut und Schleimhäute, eine Unterfunktion der T-Zell-medierte Immunität, eine geschwächte Funktion der neutrophilen Granulozyten oder eine Dysfunktion der mikrobiellen Normalflora (NOLA 2003).

Dabei wird den neutrophilen Granulozyten eine besondere Bedeutung in der Abwehr systemischer Candidainfektionen zugeschrieben, da sie im Organismus für die Elimination systemisch abgesiedelter Hefezellen zuständig sind (KAPPE 1993). Neutropenische Patienten mit Fieber, das trotz Antibiotikatherapie persistiert, tragen ein etwa 20 %-iges Risiko, eine invasive Mykose zu entwickeln (EORTC 1989, PIZZO 1982).

Dagegen spielt die durch T-Lymphozyten medierte spezifische Immunabwehr eine wichtige Rolle in der Abwehr oberflächlicher mukokutaner Candidosen. Bei HIV-Infizierten wird ein selektiver Mangel an CD4-Lymphozyten und damit eine Verminderung der Zytokinproduktion beobachtet, die dann zu einer Schwächung des zellulären Immunsystems führt. Die Folge dieser spezifischen Immundefizienz ist im späteren Stadium der Erkrankung (AIDS) bei mehr als 90 % der Erkrankten eine Candidose v.a. der Haut und Schleimhäute, während im Vergleich dazu systemische Candidosen relativ selten gesehen werden (IMBERT-BERNHARD 1994). Besonders *Candida tropicalis* und *Candida krusei* werden in wachsendem Maße bei AIDS-Patienten im fortgeschrittensten Krankheitsstadium isoliert (POLAK 2001).

Die Anzahl von präoperativ verabreichten Antibiotika wird als wichtigster Risikofaktor für eine sich perioperativ entwickelnde Candidose angesehen (WEY 1989). Eine langanhaltende Antibiotikatherapie unterdrückt die normale bakterielle Flora und verschafft damit *Candida*-Hefen die Gelegenheit zur Vermehrung, Bindung an die Mukosa und Translokation.

Große chirurgische Eingriffe, Traumata, Verbrennungen, Malignome, bakterielle Sepsis, Minderperfusion, Kortikoidtherapie, Chemotherapie, Diabetes und Transplantationen verursachen eine Immunsuppression, die den Patienten für eine *Candida*-Infektion prädisponieren (ALEXANDER 1978, BJERKNES 1989, BRADLEY 1984, HUMMEL 1992, KIRKPATRICK 1984, THALER 1988, WENZEL 1995). Candidämien sind häufig mit zentralen Venenkathetern assoziiert, die als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Mykose identifiziert wurden (BECK-SAGUE 1993, MAID 1997, REX 1994).

Auch Brandverletzte sind in erhöhtem Maße durch *Candida*-Infektionen gefährdet (HOLZHEIMER 2002). Größere Verbrennungen haben offenbar

durch eine T-Zell-Dysfunktion einen Einfluss auf die Integrität der Darmschleimhaut (PRUITT 1998).

Die Patienten können nach ihrem Risiko für eine disseminierte Candidiasis in Gruppen mit hohem und niedrigem Risiko eingeteilt werden (DEAN 1996) (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3 Risikofaktoren für disseminierte Mykosen–Einteilung in Patienten mit hohem und niedrigem Risiko nach DEAN 1996

- Akutes Nierenversagen
- Alter > 40 Jahre
- Verbrennungen zweiten und dritten Grades
- Antibiotika für mehr als sieben Tage
- Drei oder mehr Antibiotika
- Gramnegative Sepsis
- Akute Peritonitis
- Intraabdomineller Abszess
- Diabetes mellitus
- Malignom
- Parenterale Ernährung
- Polytrauma mit Beteiligung mehrerer Organsysteme
- Serum–Glucose > 200 mg/dl
- Schwere Schädel–Hirnverletzung
- Steroidmedikation

Hohes Risiko für disseminierte Mykose: drei oder mehr Risikofaktoren
Niedriges Risiko für disseminierte Mykose: weniger als drei Risikofaktoren

2.3 Klinische Bilder der Candidosen

Die Candidosen bieten ein großes Spektrum möglicher Erkrankungsmanifestationen. Je nach Abwehrlage des Patienten und der Erregervirulenz kann das klinisch Bild zwischen einer transitorischen, symptomlosen Kolonisation, einer Lokalinfection und einem systemischen Befall mehrerer Organe mit häufig letalem Verlauf variieren. Die Diagnosefindung wird dabei häufig durch die Tatsache erschwert, dass die Candidosen klinisch unspezifisch verlaufen und damit Symptome zeigen, die auch durch andere mykotische Erreger oder auch andere Erkrankungen hervorgerufen werden können.

2.3.1 Lokalinfectionen

Candidosen der Haut und Schleimhäute können durch eine lokale oder systemische Resistenzminderung bedingt sein (KORTING 2005).

Die Candidose der Mundschleimhaut kann bei Infektion im Geburtskanal sich schon beim Neugeborenen manifestieren (RIETH 1979). Beim alternden Menschen findet man die orale Candidose vor allem bei Zahnlosigkeit oder schlecht sitzenden Zahnprothesen. Die orale Candidose stellt die häufigste opportunistische Infektion bei HIV–Infizierten dar (ELLEPOLA 2000).

Die Vulvovaginalcandidose ist eine sehr häufige Erkrankung. Begünstigende Faktoren sind eine Schwangerschaft, Diabetes mellitus, orale Kontrazeptiva, Glukokortikoidtherapie, antimikrobielle Chemotherapie, gehäufter Geschlechtsverkehr, chemische Irritation sowie ein hoher Anteil süßer Speisen in der Nahrung. Eine sexuelle Übertragung kann im Einzelfall gegeben sein (SOBEL 2002, WILSON 2005). Eine Candidose der Eichel und des inneren Vorhautblattes tritt vorwiegend bei älteren und adipösen Männern auf (JEHN 1997).

Die *Candida*–Infektion der intertriginösen Räume, wie in der Leistenregion, der Achselhöhlen oder submammär, ist häufig, wobei begünstigende Faktoren wie Adipositas, Diabetes mellitus und allgemeine Abwehrschwäche eine

wesentliche Rolle spielen. Bei Inkontinenz im Säuglings- oder Greisenalter führt der Gebrauch von Windeln in dem durch ihre Anwendung geschaffenen funktionellen intertriginösen Raum leicht zu einer mazerativ erosiven Intertrigo (MAYSER 2005).

2.3.2 Tiefe Candidosen

Als systemische oder tief-lokalisierte Candidosen werden in der Regel *Candida*-Mykosen bezeichnet, bei denen tiefer gelegene Gewebe und / oder Organe befallen sind. Die tiefen Candidosen können jedes Organ für sich oder auch mehrere betreffen. Sie sind Erkrankungen mit einer hohen Komplikationsrate, die behandelt in nahezu 40 % und unbehandelt in 80 % der Fälle letal verlaufen (MÜLLER 1994). Die Hauptlokalisation der Infektion sollte genannt werden (z.B. *Candida*-Peritonitis, *Candida*-Pneumonie) (EDWARDS 1992).

Candida-Infektionen der Hirnhäute treten, besonders bei Neugeborenen, häufig in Folge einer Candidämie auf. Sie können sich jedoch auch im Zusammenhang mit einer neurochirurgischen Operation entwickeln (NGUYEN 1995, SMEGO 1984).

Candida-Endokarditis, *Candida*-Perikarditis und durch *Candida*-Arten hervorgerufene eitrige Phlebitiden sind mit einer hohen Mortalität assoziiert (WALSH 1980). Trotz chirurgischer und antimykotischer Therapie überleben nur 20 % der Patienten mehr als zwei Jahre (ELLIS 1998). Falls eine infizierte Herzklappe nicht entfernt werden kann, wird eine lebenslange Therapie mit Fluconazol empfohlen (BADDOUR 1995). Das chirurgische Débridement ist die wichtigste Maßnahme bei der *Candida*-Perikarditis (RABINOVICI 1997).

Eine Pilzpneumonie ist in ihrer Symptomatik uncharakteristisch und macht eine gezielte Suche nach dem Erreger notwendig. *Candida*-Pneumonien sind bei onkologischen Patienten mit einer hohen Letalität assoziiert. Sekundäre *Candida*-Pneumonien werden vor allem bei hämatogen disseminierter Candidiasis beobachtet (HARON 1993, PANOS 1988).

Eine *Candida*-Peritonitis kann bei Patienten unter Peritonealdialyse oder im Verlauf eines bauchchirurgischen Eingriffes oder eines Traumas mit Verletzung des Darms auftreten. Im letzten Fall handelt es sich meist um polymikrobielle Infektionen, bei denen Hefen der Gattung *Candida* nur ein Erreger unter mehreren darstellen, dennoch ist eine antimykotische Therapie indiziert (BAYER 1976, CALANDRA 1989, SOLOMKIN 1980). Bei intraabdominellen Infektionen und bei Proben aus dem Pankreasbereich werden *Candida*-Arten häufiger nachgewiesen (HOLZHEIMER 1990). Im Rahmen einer peripankreatischer Sepsis werden *Candida*-Spezies wesentlich häufiger isoliert als früher angenommen, diese Infektionen können mit einer hohen Mortalität assoziiert sein (ALOIA 1994). Bei einer septischen Cholangitis wird häufig *Candida tropicalis* in der Galle und Blutkultur nachgewiesen.

Die hepatolienale Candidose wird vorwiegend bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen nach Beendigung der Aplasiephase diagnostiziert. Bei bildgebenden Untersuchungen werden häufig Herde in Leber und Milz gefunden (CHUN 1980, KONTOYIANNIS 2000).

Blasenkatheter, Antibiotikatherapie und fortgeschrittenes Alter erhöhen das Risiko für eine Candidose der Harnwege. Die Infektion kann stumm oder unter dem Bild einer chronischen Zystopyelitis oder Pyelonephritis verlaufen. Zeichen der Niereninsuffizienz bis hin zur Urämie sind möglich. Eine Candidurie kann durch eine akute hämatogen disseminierte Candidose bedingt sein (ANG 1993, NASSOURA 1993, WISE 1993). Der Wechsel des Blasenkatheters eliminiert eine Candidurie in lediglich 20 % der Fälle, während die Entfernung des Katheters bei 40 % der Patienten zum Erfolg führt (SOBEL 2000). Eine Therapie ist bei symptomatischen Patienten sowie generell bei Neutropenie, nach Nierentransplantation und bei bzw. nach Eingriffen an den Harnwegen angezeigt.

Eine Pilzsepsis ist eine schwere, teils tödlich verlaufende Allgemeininfektion mit Metastasierung in verschiedene Organe bei prädisponierten Patienten. Sie ist von der symptomlosen Fungämie zu unterscheiden. *Candida*-Septikämien gehen häufig mit klinisch unspezifischen Symptomen wie Fieber,

Abgeschlagenheit, Müdigkeit und erhöhten Entzündungswerten einher und weisen eine hohe Letalität auf (WEY 1988). Bei neutropenischen Patienten ist der Darmtrakt als Infektionsquelle bedeutsam. Bei nicht-neutropenischen Patienten ist die Entfernung aller zentralvenösen Katheter angezeigt (NGUYEN 1995, REX 1995).

Eine Candidämie entwickeln 3 % - 5 % der Verbrennungspatienten, die Gesamtletalität beträgt 50 % - 70 % (MacMILLIAN 1972, SPEBAR 1981). Die Inzidenz von invasiven Mykosen bei Empfängern von Organtransplantaten liegt zwischen 5 % bei Nierentransplantierten bis 50 % bei Patienten nach Lebertransplantation (CASTALDO 1991). Retransplantation, hoher Risikoscore, Gallengangsrekonstruktion, Steroidtherapie, bakterielle Infektionen, Antibiotikatherapie und vaskuläre Komplikationen sind entscheidende Risikofaktoren für die Entwicklung einer Pilzinfektion (CASTALDO 1991).

Bis zu 60 % aller *C. tropicalis*-infizierten Sepsispatienten versterben innerhalb eines Monats nach Pilznachweis (BEDINI 2006); damit besitzt *Candida tropicalis* die höchste Mortalitätsrate bei einer Candidämie (ALMIRANTE 2005).

2.4 Diagnostik der Candidosen

Die hohe Mortalität der systemischen Candidainfektionen macht eine möglichst frühzeitige Diagnosestellung erforderlich. Die Diagnosefindung ist immer noch mit Schwierigkeiten behaftet. Die klinische Diagnose einer *Candida*-Infektion ist schwierig, da die Symptome unspezifisch sind. Die Labordiagnose wird erschwert durch schwierige Materialentnahmetechnik oder häufige falschnegative Untersuchungsbefunde.

Basis der klinischen Diagnostik ist eine gezielte Anamneseerhebung und eine gründliche körperliche Untersuchung unter Beobachtung möglicher Infektionsfoci, aus denen sich dann der Verdacht einer Mykose stellen kann. Laborchemische Untersuchungen sowie der gezielte Einsatz von bildgebenden

Verfahren können die Verdachtsdiagnose zwar erhärten, aber keinen sicheren Nachweis erbringen.

Hierfür ist die spezielle mykologische Diagnostik unabdingbar. Grundvoraussetzung ist zunächst der fachgemäße Gewinn und Transport der Untersuchungsmaterialien (HERRMANN 1993). An erster Stelle der mykologischen Spezialdiagnostik steht die mikroskopische Untersuchung des Probenmaterials. Das Präparat kann entweder nativ oder nach spezieller Anfärbung zur besseren Darstellung der Erreger beurteilt werden (KRAUSE 1988). Bei ausreichend hoher Keimzahl wird mikromorphologisch der Verdacht einer Pilzinfektion gestützt. Um falschpositive Befunde durch Artefakte und falschnegative Ergebnisse durch zu geringe Keimzahlen zu vermeiden und da durch die Mikroskopie allein keine definitive Aussage zur Pilzspezies getroffen werden kann, schließt sich an die mikroskopische die kulturelle Untersuchung der Erreger an.

Das mikrobiologische Labor muss über den klinischen Pilzverdacht informiert werden, da gezeigt werden konnte, dass nur etwa 20 % der mit mykologischen Kulturmethoden nachweisbaren Hefen auch in der alleinigen bakteriologischen Routinediagnostik gefunden werden konnten (FEGELER 1993).

Die Primärkulturen können auf gelierten Standardnährböden mit Kohlenhydrat- und Aminosäurequelle (Sabouraud-Glucose-Agar, Kimmig-Agar) angelegt werden, denen Cycloheximid und antibakterielle Wirkstoffe zugesetzt werden, um das Wachstum von Anflugkeimen oder bakteriellen Kontaminationen zu unterdrücken (KRAUSE 1988). Hefen zeigen innerhalb weniger Tage ein sichtbares Wachstum und können makroskopisch hinsichtlich der Form und Farbe ihrer Kolonien sowie erneut mikroskopisch beurteilt werden. Mit Hilfe des Auxanogramms ist die definitive Artzuordnung eines Isolates möglich. Dabei stehen kommerzielle Test-Kits zur Verfügung, die untersuchen, ob die zu beurteilende Hefe definierte Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen aerob zu verstoffwechseln vermag (Assimilation) oder ob es ihr möglich ist, einzelne Kohlenhydrate anaerob unter Kohlendioxidbildung zu fermentieren (BARNETT 1983, LODDER 1971).

Positive Hefekulturen sind nicht immer beweisend für eine invasive oder disseminierte Infektion (KUJATH 1990, RUTLEDGE 1986). Sicher ist die Diagnose nur unter der Bedingung, dass histopathologisch eine Hefepilzinvasion nachweisbar ist oder Hefen in obligat sterilen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können. Wird keine dieser Anforderungen erfüllt, ist die Diagnose nur über Ausschluss zu sichern. Bei der Beurteilung Kontamination versus echte Infektion sprechen für eine Infektion eine hohe Erregermenge, wiederholte Nachweise in gleichen Untersuchungsmaterialien, der gleichzeitige Nachweis der gleichen Pilzart in mehreren Untersuchungsproben sowie entsprechende myko-serologische Befunde (Antigen-, Antikörpernachweise).

Der Stellenwert der serologischen Untersuchungen wird häufig kontrovers diskutiert. Sie können in der Regel nicht allein zur Diagnosestellung herangezogen werden, doch stellen sie unter Berücksichtigung der immunologischen Grundlagen wertvolle und hilfreiche Bausteine in der mykologischen Diagnostik dar. Serielle Untersuchungen oder Paralleluntersuchungen mit unterschiedlichen Verfahren können dabei die Aussagekraft erheblich verbessern (FEGELER 1994, RÜCHEL 1993).

Weitere nichtkulturelle Nachweisverfahren bedienen sich molekularbiologischer Methoden z.B. der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder beruhen auf dem Nachweis von Pilzmetaboliten (D-Arabinitol), spezifischer Enzyme (Enolase) oder Zellwandbestandteilen wie Mannan und Beta-1,3-Glucan (IKEDA 1990, PODZORSKI 1989, WALSH 1991). Diese Verfahren werden jedoch nur vereinzelt in der Routinediagnostik eingesetzt und sind zum größten Teil nur „Haus-standardisiert“.

2.5 Therapie der tiefen Candidosen

2.5.1 Allgemeine Behandlungsformen

Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Kausalbehandlung der Candidosen stellen die Minderung bzw. die Elimination prädisponierender Faktoren dar.

Entscheidend ist dies vor allem für die invasiven Mykosen, bei denen die Prognose des Patienten in hohem Maße von der Minimierung von Risikofaktoren abhängig ist. Mögliche Infektionsquellen wie potentiell infizierte intravaskuläre Katheter müssen bei Verdacht auf eine Pilzsepsis eliminiert werden (COMO 1994).

Bei lokalisierten Prozessen wie bei der *Candida*-Endokarditis muss in Einzelfällen neben der medikamentösen Behandlung auch ein primär chirurgisches Vorgehen erwogen werden.

2.5.2 Spezifische Behandlungsformen

Superfizielle Infektionen durch Hefen können in der Regel gut durch die Gabe topisch wirksamer Antimykotika beherrscht werden. Für die systemischen Pilzinfektionen ist jedoch die systemische Gabe der Antimykotika erforderlich, für die nur eine begrenzte Anzahl an Substanzen zur Verfügung steht. Die ideale antimykotische Substanz sollte eine breite und potente antimykotische Wirkung, eine gute Verträglichkeit, eine günstige Pharmakokinetik und eine geringe Resistenzprävalenz besitzen. Keines der heute erhältlichen Substanzen zur Behandlung der systemischen Candidosen wird allen diesen Ansprüchen gerecht. Als wichtigste verfügbare Substanzen zur Behandlung der tiefen Candidamykosen gelten Amphotericin B, Flucytosin, die Azolantimykotika Fluconazol und Voriconazol sowie das Echinocandin Caspofungin.

Amphotericin B gehört zu den Makrolid-Polyen-Antibiotika, wurde aus Kulturfiltraten von *Streptomyces nodosus Venezuela* isoliert und 1955 erstmalig beschrieben. Der Wirkmechanismus wird bis heute noch nicht völlig verstanden. Das gegenwärtige Modell gründet auf der Bildung eines 1:1 Amphotericin B/Sterin-Aggregates. Durch dieses kommt es zur Bildung von transmembranen Poren. Infolge dieser Interaktionen besteht eine Störung der lebenswichtigen Ergosterin-Funktion. Es entsteht eine erhöhte Permeabilität der Membran, eine Unterbrechung des Protonengradienten und oxydative Reaktionen werden

initiiert (SCHNEEMANN 1992). Amphotericin B wirkt in vitro fungizid. Pharmakokinetische Schwachpunkte bei der systemischen Therapie mit Amphotericin B sind die geringe Resorption der Substanz, die eine parenterale Verabreichung erforderlich macht, und die sehr geringen Liquorkonzentrationen (nur 10 % der Serumkonzentration) (SEELIGER 1994). Amphotericin B ist nicht hämodialysierbar. Ein weiterer großer Nachteil besteht in der hohen Rate von unerwünschten Wirkungen, die mit der Bindungsaffinität der Substanz an das Cholesterin der menschlichen Zytoplasmamembran erklärt wird (HAY 1991). Die wichtigste mögliche Nebenwirkung durch Amphotericin B ist die nicht strikt dosisabhängige und unter Umständen irreversible Nephrotoxizität, die mit Hypokaliämie, Hypomagnesiämie und erhöhten Kreatininspiegeln einhergehen kann (WALSH 1988). Eine unter Amphotericin B-Behandlung aufgetretene Niereninsuffizienz ist mit einer höheren Mortalitätsrate assoziiert (LORTHOLARY 2004). Zudem treten gerade zu Beginn der Therapie bei den ohnehin schwerkranken Patienten unter der Infusion unangenehme Allgemeinsymptome wie Fieber, Schüttelfrost, Rigor oder Übelkeit auf. 75 % der Patienten erkranken an einer reversiblen Anämie. Eine weitere toxisch bedingte Komplikation ist die infusionsbedingte Phlebitis. Versuche, diese unerwünschten Reaktionen zu minimieren, bestehen in der einschleichenden Gabe, der parallelen Verabreichung von Kochsalzinfusionen zur Erhaltung der normalen Nierenfunktion und in der Veränderung der galenischen Zubereitung als liposomal verkapseltes Amphotericin B oder an einen Lipidkomplex gebundene Substanz, durch die die Verträglichkeit der Substanz deutlich verbessert werden konnte (HIEMENZ 1996, LOPEZ-BERESTEIN 1989).

Da invasive Mykosen sich bei älteren Erwachsenen zu einem wachsenden Problem entwickeln, sollte Amphotericin B als Standardtherapeutikum wegen seiner Toxizität durch die weniger toxischen Azole ersetzt werden (GALLIS 1996, KAUFFMAN 2001).

Flucytosin, ein Pyrimidinderivat, ist das einzige Antimykotikum, das als echter Antimetabolit wirkt. Es wurde erstmals 1957 von DUCHINSKY synthetisiert und besitzt ein vorwiegend auf Hefen begrenztes Aktivitätsspektrum

(GEMEINHARDT 1976). Die fungistatische und fungizide Wirkung gegenüber *Candida*-Hefen beruht auf der Penetration von Flucytosin in die Pilzzelle mit Hilfe der Cytosinpermease und der nachfolgenden Hemmung der RNS- und DNS-Synthese der Pilzzelle (POLAK 2001). Pilzzellen, denen die Cytosinpermease fehlt, sind gegenüber Flucytosin primär resistent. Flucytosin wird vom Intestinaltrakt schnell resorbiert und die maximale Serumkonzentration bereits nach 1–2 Stunden erreicht. Bei schweren Verläufen einer Hefeinfektion z.B. bei der *Candida*-Sepsis ist neben der oralen Gabe auch die intravenöse Injektion verfügbar. Aufgrund der hohen Bioverfügbarkeit und der starken Gewebepenetration werden hohe Urin- und Liquorkonzentrationen erzielt (STEER 1972). Ein weiterer erheblicher therapeutischer Vorteil von Flucytosin besteht darin, dass die gute Resorbierbarkeit aus dem Magen-Darm-Trakt mit einer nahezu 100 %-igen Ausscheidung durch die Nieren assoziiert ist. Auch kann die Dosis dem funktionellen Nierenstatus angeglichen werden. Eine Nierentoxizität konnte nicht nachgewiesen werden. Der Hauptnachteil von Flucytosin ist die schnelle Resistenzentwicklung der Hefen, weshalb häufig nicht eine Monotherapie, sondern eine Kombinationsbehandlung, in der Vergangenheit vor allem mit Amphotericin B, durchgeführt wird. Durch teilweise Metabolisierung in das schleimhauttoxische 5-Fluoruracil können gastrointestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe auftreten (SCHAEFER-KORTING 1993). Bei längerer Zeit erhöhten Serumspiegeln oberhalb von 100 µg/ml ist eine Knochenmarksdepression mit folgender Leukopenie oder Thrombopenie möglich. Nicht selten werden diese unter der gleichzeitigen Therapie mit Amphotericin B beobachtet, da dessen nephrotoxische Wirkung eine verringerte Flucytosin-Ausscheidung zur Folge hat. Leberschädigungen mit Erhöhung der Leberenzyme können mit oder ohne Hepatomegalie bei etwa 5 % der Patienten auftreten. Regelmäßige Bestimmungen des Flucytosin-Serumspiegels, des Blutbildes sowie der Nieren- und Leberparameter werden daher empfohlen.

Fluconazol gehört zu den neueren Antimykotika, die bei systemischen Candidosen Verwendung finden. Chemisch gehört es zu den Triazolen, einer

Substanzgruppe mit breiter fungistatischer Wirkung, die sich historisch von den schon seit den 1960er Jahren angewendeten Imidazol-Antimykotika (Clotrimazol, Ketokonazol, Miconazol) ableiten. Beide Gruppen werden in der Regel wegen der gemeinsamen stickstoffhaltigen aromatischen Ringe als „Azole“ zusammengefasst. Fluconazol stört die Funktion der Zellmembran durch Eingreifen in die Cytochrom-P-450-abhängige Lanosterin-C14-Demethylase und führt dadurch zur Verringerung von Ergosterin in der Zellmembran. Durch die Verringerung von Ergosterin werden membrangebundene Enzyme in ihrer Funktion eingeschränkt und so eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran erreicht. Die Reduktion von Ergosterin bewirkt außerdem eine Abnahme der Angriffstellen für Polyene, was zu einer antagonistischen Wirkung mit Amphotericin B führt (POLAK 2001). Zusätzlich können Azole Störungen der Atmungskette, direkt toxische Veränderungen an den Membranphospholipiden und eine Verhinderung der Pseudomycelbildung bewirken (GEORGOPAPADAKOU 1996, SAAG 1988). Das antimykotische Spektrum umfasst vor allem opportunistische Pilze wie *Candida albicans*, *Candida tropicalis* und *Candida parapsilosis* (POLAK 2001, ST-GERMAIN 1999).

Fluconazol zeichnet sich gegenüber den älteren Azolen, Amphotericin B und Flucytosin durch wesentlich günstigere pharmakokinetische Eigenschaften und ein deutlich geringeres Nebenwirkungsprofil aus. Fluconazol ist wasserlöslich, oral und intravenös applizierbar und besitzt unabhängig von der Nahrungsaufnahme und der Azidität des Magensaftes eine hohe Bioverfügbarkeit. Fluconazol verteilt sich gut in allen Körperflüssigkeiten und erreicht mit 80 % hohe Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis und in den Augen (COMO 1994, DEBRUYNE 1993, TERRELL 1999). Fluconazol wird kaum metabolisiert und wird als unveränderte Muttersubstanz über die Nieren ausgeschieden. Fluconazol ist hämodialysierbar (SEELIGER 1994). Bei oraler Verabreichung besteht über einen weiten Dosierungsbereich eine lineare Beziehung zwischen der verabreichten Fluconazol-Dosis und der erreichten Plasmakonzentration (PITTROW 1996, WILDFEUER 1996). Im Gegensatz zu der auch beim Menschen nachweisbaren Suppression der

Steroidhormonsynthese durch Ketoconazol ruft Fluconazol aufgrund seiner spezifischeren Wirkung auf das Pilz–Cytochrom keine endokrinen Störungen hervor. Bei weniger als 5 % der Patienten treten Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, ein Hautausschlag oder asymptomatische Erhöhungen der Aminotransferasen auf (COMO 1994). Auch Kinder und Neugeborene vertragen Fluconazol gut (MOREIRA 2005). Bei der oropharyngealen *Candida*–Infektion und bei der Soorösophagitis ist Fluconazol bei AIDS–Patienten das Mittel der Wahl (JUST–NÜBLING 1994, KAUFFMAN 1997). Die beschriebenen Vorteile führten seit Einführung des Präparates im Jahr 1990 dazu, dass diese Substanz zunehmend als Alternative neben dem bisher favorisierten Amphotericin B bei der Behandlung tiefer Mykosen eingesetzt wird. Wegen seiner besseren Verträglichkeit und guten Wirksamkeit hat Fluconazol das Amphotericin B als Mittel der Wahl bei der Behandlung von Candidämien und systemischen Candidosen bei nicht–neutropenischen Patienten sogar verdrängt (POLAK 2001).

Voriconazol ist die zur Behandlung von systemischen Candidosen eingesetzte letzte auf den Markt gebrachte Substanz und zählt wie das Fluconazol als Sterinbiosynthesehemmer zu den systemisch wirksamen Triazolen (JEU 2003). Als Triazol wirkt es ebenso wie Fluconazol als Lanosterol–C14–Demethylase–Inhibitor (GERMAUD 2004). Es ist als intravenöse und orale Applikationsform erhältlich (BOUCHER 2004). Voriconazol verteilt sich gut über den ganzen Körper, hat eine orale Bioverfügbarkeit von 90 % und eine Halbwertszeit von etwa sechs Stunden (GUPTA 2003). Voriconazol wird nicht unverändert durch die Niere, sondern durch einen extensiven Leber–Metabolismus ausgeschieden. Aus diesem Grund ist Voriconazol bei Patienten mit gestörter Leberfunktion wie auch unter gleichzeitiger Therapie mit über die Leber metabolisierenden Medikamenten nur mit Vorsicht und unter Dosisanpassung einzusetzen. Neben der Hepatotoxizität mit Erhöhung der Leberenzyme gehören zu den unerwünschten Nebenwirkungen Sehstörungen und Hautreaktionen. Die Leber–und Nierenparameter sind unter der Behandlung mit Voriconazol regelmäßig zu kontrollieren (JEU 2003).

Voriconazol besitzt auch eine gute Wirksamkeit gegenüber vielen Schimmelpilzen, insbesondere *Aspergillus*-Arten, hat jedoch eine Wirklücke bei Pilzen der Ordnung Mucorales.

2.5.3 Kombinationstherapie

Seit dem erstmaligen Nachweis der synergistischen Wirkung von Flucytosin und Amphotericin B im Jahr 1971 hat die Kombinationstherapie sich einen Platz in der antimykotischen Chemotherapie erobert (MEDOFF 1971).

Eine Kombinationstherapie sollte im Vergleich zu einer Monotherapie die Anforderungen einer Erweiterung des Spektrums, einer Erhöhung der Wirksamkeit und einer Reduktion des Auftretens von resistenten Stämmen erfüllen. Untersuchungen *in vitro* und insbesondere an Tiermodellen zeigten, dass eine reale Zunahme der Wirksamkeit bei einigen Indikationen erzielt werden kann. Einige Kombinationen sollten jedoch vermieden werden, da sie antagonistisch wirken. Amphotericin B und die Gruppe der Azole sollten aus diesem Grund nicht miteinander kombiniert werden, da durch die azolbedingte Abnahme der Angriffstellen für Polyene Amphotericin B nicht seine Wirkung entfalten kann (LEWIS 1998, POLAK 1999). Aufgrund seiner zumeist additiven bzw. synergistischen Wirkung gegen die meisten opportunistischen Pilzstämme war die Kombination aus Flucytosin und Amphotericin B lange Zeit der „Goldstandard“ in der antimykotischen Kombinationstherapie.

Nach Einführung der vergleichsweise nebenwirkungsarmen und pharmakokinetisch günstigen Antimykotika vom Triazoltyp wie Fluconazol stellte sich die Frage, ob diese nicht die mit einer Reihe von Nachteilen verbundene Standardbehandlung systemischer Candidosen mit Amphotericin B (mit oder ohne Flucytosin) ersetzen könnten. Eine Vergleichsuntersuchung mit 90 Leukämiepatienten in der Remissionsinduktions-Phase zeigte, dass unter prophylaktischer Antimykotika-Gabe bei oral verabreichtem Fluconazol im Vergleich zu intravenös gegebenem Amphotericin B seltener Pilzinfektionen auftraten und seltener Nebenwirkungen beobachtet wurden (BODEY 1994).

Eine weitere Studie mit 502 Kindern mit hämatoonkologischen Erkrankungen zeigte ebenfalls eine höhere prophylaktische Effektivität und eine geringere Nebenwirkungsrate von Fluconazol gegenüber oral verabreichten Polyenantimykotika (Amphotericin B, Nystatin) (NINANE 1994). Auch bei Durchführung einer Interventionstherapie bei positivem Pilznachweis konnte eine gleichwertige Effizienz der Fluconazoltherapie verglichen mit der Amphotericin B–Standardtherapie bei invasiven Candidainfektionen nachgewiesen werden (COMO 1994). Bei Neugeborenen wurden unerwünschte Nebenwirkungen bei Fluconazol–Gabe seltener und in milderer Ausprägung gesehen als unter Therapie mit Amphotericin B (FRATTARELLI 2004). Diese Ergebnisse sprechen somit für eine realisierbare Primärtherapie mit Fluconazol (ANAISSIE 1996–a und 1996–b).

Während Fluconazol seinen festen Platz in der Monotherapie von systemischen Candidosen innehat, wird Flucytosin aufgrund der schnellen Resistenzentwicklung der Hefen zunehmend nur in einer Kombinationsbehandlung eingesetzt (YONGA 1995).

Die meisten Untersuchungen zur antimykotischen Kombinationstherapie existieren über die Kombination von Amphotericin B und Flucytosin. Diese Kombination ist auch heute noch die Therapie der Wahl für die akute Phase der *Kryptokokken–Meningitis* (BÖHME 2003). In der Behandlung anderer systemischer Mykosen werden jedoch zunehmend Antimykotika vom Azol–Typ wie Fluconazol und andere Kombinationen eingesetzt. Bei der Durchführung einer Interventionstherapie bei positivem Pilznachweis konnte bei chirurgischen Patienten mit nachgewiesener systemischer Candidose zwar unter der Kombinationstherapie mit Amphotericin B und Flucytosin eine schnellere Keimelimination beobachtet werden, Fluconazol konnte dagegen die gleiche Heilungsrate aufweisen (KUJATH 1993). Ähnlich zeigte sich bei neutropenischen Patienten mit hämatoonkologischen Erkrankungen, dass Fluconazol genauso effektiv war wie die Kombination Amphotericin B/ Flucytosin (SILLING 1999).

Da Fluconazol in der Behandlung systemischer Mykosen bei besserer Verträglichkeit bei Erwachsenen wie bei Kindern einen ähnlichen

therapeutischen Benefit erbringt wie Amphotericin B mit oder ohne Flucytosin, wurde die Kombinationstherapie von Fluconazol mit Flucytosin eingeführt. Ein wichtiger Vorteil in der Verträglichkeit dieser Kombinationstherapie im Vergleich mit der gleichzeitigen Behandlung von Flucytosin mit Amphotericin B ist, dass die sich in der Kombination potenzierende nephrotoxische Wirkung von Amphotericin B und Flucytosin mit dem Einsatz von Fluconazol gemieden werden kann. Aufgrund unterschiedlicher Wirkungsmechanismen und fehlender Interaktion kann Flucytosin sowohl mit Amphotericin B als auch mit Fluconazol kombiniert werden (BÜCHNER 2002).

Die Kombination von Flucytosin mit Azolen erweist sich in den meisten Fällen als wirkungsverstärkend, Antagonismus wurde nur in Einzelfällen beschrieben (POLAK 1999). Bei der Behandlung von durch *Cryptococcus neoformans* ausgelösten Mykosen konnten synergistisches Verhalten und höhere Erfolgsquoten in der Kombination von Fluconazol und Flucytosin nachgewiesen werden (SAAG 2000, WALSH 1992, YAMAMOTO 1997). Da beide Substanzen liquorgängig sind, hatten bei einer Untersuchung von AIDS-Patienten mit einer Kryptokokken-Meningitis 75 % der Patienten zehn Wochen nach Beginn der Therapie negative Kulturbefunde im Liquor cerebrospinalis. Unter Monotherapie mit Amphotericin B oder Fluconazol waren nur 35–40 % der Kulturen negativ (LARSEN 1994). JUST-NÜBLING (1994) berichtet bei Behandlung mit einer Tripel-Therapie aus Amphotericin B, Fluconazol und Flucytosin über eine Heilung der *Cryptococcus*-Meningitis bei über 80 % der untersuchten Fälle (n = 18/22). Diese Therapieerfolge sind vor allem unter dem Aspekt erwähnenswert, dass die HIV-assoziierte Kryptokokkose in Deutschland bei etwa 5 % der AIDS-Patienten gesehen wird (MÜLLER 1994).

Zunehmend werden auch therapeutische Erfolge in der Behandlung von systemischen Candidosen mit der Kombinationstherapie Fluconazol und Flucytosin beschrieben. Eindrucksvolles synergistisches Verhalten wurde beispielsweise für die invasive Infektion mit *Candida glabrata* beobachtet (POLAK 2001). Bei neutropenischen Patienten wurden bessere Erfolgsraten bei invasiven Candidosen nachgewiesen als unter einer Monotherapie mit

Amphotericin B (ANAISSIE 1993). Für die antimykotische Behandlung der durch *Candida albicans* bedingten Endophthalmitis, Pyelonephritis und Endokarditis im Hasen-Modell zeigte sich, dass Fluconazol und Flucytosin effektiver waren als eine Monotherapie mit Fluconazol, Flucytosin oder Amphotericin B (mit oder ohne Flucytosin) (LOUIE 1999). Gerade bei Neugeborenen mit einer *Candida*-Meningitis/ -Enzephalitis oder einer *Candida*-Endokarditis könnte eine Kombination mit Fluconazol/ Flucytosin zum Erfolg führen, da von Neugeborenen Amphotericin B schlechter als von Erwachsenen vertragen wird (POLAK 1999). Auch die *Candida*-Osteomyelitis oder -Arthritis sollte ebenfalls mit einer Kombinationsbehandlung behandelt werden, da über die Wirksamkeit von einer Fluconazol-Monotherapie bei diesen Lokalisationen noch nicht viel bekannt ist. Fluconazol und Flucytosin scheint hier vor allem bei Heroinabhängigen wirksam zu sein (FILLER 1995). Die Heilung einer *Candida*-Peritonitis unter Dialyse ist unter einer Monotherapie ohne Entfernung des Katheters nicht möglich. Die Kombinationstherapie hat jedoch ohne Katheterentfernung zu hohen Heilungsraten von > 93 % geführt (CHENG 1989). Die Kombination von Amphotericin B mit Flucytosin zeigt ihre höchste Erfolgsquote bei Infektionen, die durch *Candida tropicalis* verursacht waren, eine Spezies, die generell resistenter gegen Amphotericin B ist als *Candida albicans*. Es wird jedoch vermutet, dass die Kombination Fluconazol und Flucytosin in diesen klinischen Situationen ähnlich effektiv oder erfolgreicher sein kann (ELLIS 1998).

2.5.4 Epidemiologie der in-vitro-Resistenzen der Gattung *Candida* gegenüber den Antimykotika Flucytosin und Fluconazol

Primärresistenzen gegenüber Flucytosin werden relativ häufig beschrieben. Je nach Dauer und Dosierung der Therapie oder während der Durchführung einer Kombinationstherapie treten auch sekundäre Resistenzen in starker Größenvariabilität auf. Bei *Candida albicans* ist der Resistenzanteil von 7–8,5 % in Europa, Asien, Australien und Neuseeland, bis 20 % in den USA und Afrika

beziffert worden (DERMOUMI 1982, WEGMANN 1994). Diese Diskrepanzen wurden mit der regional unterschiedlichen Häufigkeit der *Candida albicans*-Serotypen A und B erklärt, da Stämme des Typs B häufiger resistent sind. *Candida albicans* ist jedoch ein diploider Organismus. Erst wenn eine Mutation auf beiden Allelen erfolgt, ist die Zelle völlig Flucytosin-resistent. Bei *Candida albicans*-Serotyp B wird jedoch gehäuft nur eine Mutation auf einem Allel angetroffen; das bedeutet, dass diese Isolate nicht vollständig resistent sind, sondern noch eine partielle Empfindlichkeit zeigen (AUGER 1979, STILLER 1982). *Candida glabrata*, das resistent gegenüber Azolantimykotika ist, reagiert dagegen auf Flucytosin hochsensibel (FIDEL 1999). Bei anderen *Candida non-albicans*-Stämmen werden wesentlich häufiger resistente Stämme nachgewiesen. Gegenüber *Candida tropicalis* sind die Literaturangaben nicht einheitlich. Während in einigen Untersuchungen nahezu jeder zweite untersuchte Stamm resistent gegenüber Flucytosin ist, berichten andere Autoren v.a. aus den USA, Spanien und Japan über wesentlich geringere Raten von bis zu 4,5 % Flucytosin-resistenter Stämme bzw. von deutlich niedrigeren MIC₉₀-Werten um 0,25 µg/ml (BERENQUER 1995, BORG-VON ZEPELIN 2005, DEI-CAS 1991, OHKAWA 1990, PFALLER 1994). POLAK-WYSS (1989) wies dagegen bei *Candida tropicalis*-Stämmen bei einer Breakpoint-MHK von ≥ 32 µg/ml einen Resistenzanteil von 42,7 % nach. Definiert man eine Resistenz bereits bei einem Breakpoint-MHK von ≥ 16 µg/ml, so zeigten POTEL (1982) und WEBER (1991) sogar 64 % - 70 % Flucytosin-resistente Stämme.

Bis in die späten 1980er Jahre war die Entstehung einer klinisch bedeutsamen Azolresistenz selten. In den letzten Jahren wurde jedoch vermehrt über Therapiemisserfolge verbunden mit dem Auftreten von resistenten Isolaten berichtet, insbesondere im Falle von AIDS-Patienten, die kontinuierliche oder intermittierende Fluconazol-Therapien gegen oropharyngeale Candidose erhielten (COMO 1993, DUPONT 1996, ZINGMAN 1996). Dagegen existieren nur wenige Berichte, in denen das Auftreten von primärer Fluconazol-Resistenz

bei HIV–negativen Patienten bei rezidivierender oraler Candidose beschrieben wird (GOFF 1995, RUHNKE 1994).

Candida albicans gilt in den meisten Fällen als empfindlich gegenüber Fluconazol. Bei Sepsispatienten wurde über einen Anteil von 4,6 % resistenter Hefen berichtet (DERMOUMI 1992). Auch über eine Azolresistenz bei kritisch kranken Patienten mit invasiver Candidiasis wurde berichtet (YOON 1999). Zunehmend werden aber Resistenzen bei den immer häufiger beobachteten *Candida–non–albicans*–Spezies gesehen. Die zunehmende und häufig unkritisch eingesetzte Prophylaxe mit Fluconazol wird von einigen Autoren als Ursache für die steigende Häufigkeit von resistenten *Candida–non–albicans*–Stämmen vermutet (GIRMENIA 2001, NGUYEN 1996). SCHMALRECK (1996) beobachtete in einer Untersuchung an *C. tropicalis*–Stämmen einen Resistenzanteil von 19,8 % der Isolate, jedoch lag die Resistenzgrenze in der Untersuchung mit einer MHK von $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ niedriger als in anderen Untersuchungen. Andere Autoren berichteten dagegen über einen geringeren Anteil resistenter Stämme (BEDINI 2006: 3,2 %). Allerdings wurde in diesen Studien die MHK bei $\geq 64 \text{ mg/l}$ festgelegt. Die meisten Autoren stimmen in ihren Ausführungen mit den vorliegenden Ergebnissen überein, dass Fluconazol eine gute Empfindlichkeit gegenüber *Candida tropicalis* zeigt. ST–GERMAIN (1999) konnte bei Patienten mit *Candida tropicalis*–Infektion, die zuvor noch kein Azolantimykotikum erhalten hatten, mittels in vitro–Testung über 48 Stunden bei keinem Stamm eine Resistenz gegenüber Fluconazol nachweisen.

MIKAMI (1992) und SCALARONE (1991) fanden gegenüber *C. albicans* einen Synergismus zwischen Flucytosin und Fluconazol.

Für *C. tropicalis*, die zu den häufigsten pathogenen Hefen gehört, fehlen jedoch Aussagen zum in–vitro–Empfindlichkeitsverhalten bei gleichzeitigem Einwirken von Flucytosin mit Fluconazol an klinischen Isolaten der Routinediagnostik.

Daher war es Ziel der nachfolgenden Untersuchungen die Empfindlichkeitsverteilung von *C.tropicalis*–Isolaten der klinischen Routinediagnostik gegenüber Flucytosin, Fluconazol und Voriconazol zu ermitteln, um dann anhand von Isolaten mit bestimmten

Empfindlichkeitsverhalten die in-vitro-Empfindlichkeit gegenüber Flucytosin in Kombination mit Fluconazol als eine Grundlage für die Beurteilung einer Kombinationstherapie zu untersuchen und zu analysieren.

3 Material und Methode

Gemäß den Fragestellungen ergaben sich 2 Untersuchungsphasen. In der ersten Untersuchungsphase wurde mittels eines Breakpoint-Testes (BPT) im Sinne eines Suchtestes die Empfindlichkeit von *Candida (C.) tropicalis* Isolaten gegenüber den drei Antimykotika Fluconazol (FLC), Voriconazol (VOR) und Flucytosin (FCY) ermittelt, um dann in der zweiten Untersuchungsphase bei Stämmen mit bestimmten Empfindlichkeitsmustern aus diesem Kollektiv mittels der Empfindlichkeitsbestimmung in Kreuztitration (Checkerboard-Testung) Fragestellungen der Kombinationstestungen als Grundlagen für die antimykotische Kombinationstherapie zu untersuchen. Bei beiden Testverfahren handelt es sich um Dilutionsteste in flüssigen Nährmedien.

3.1 Material

3.1.1 Hefestämme

Untersucht wurden 273 unselektionierte *C. tropicalis*-Isolate der mykologisch-klinischen Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikum der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster. Diese Isolate entstammten unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien verschiedener Patientenklientele. Die Gattungs- und Artbestimmung erfolgte anhand der Mikromorphologie (Reisagar) sowie des biochemischen Leistungsvermögens mittels Fermentation und Assimilation (BARNETT et al. 1983, LODDER 1971) bzw. teils mittels des API ID32C der Fa. BioMérieux.

Zusätzlich wurden Referenz- und Kontrollstämme verschiedener Hefearten sowohl in der ersten Untersuchungsphase (Breakpoint-Testung) (Tabelle 3.1) als auch in der zweiten Untersuchungsphase (Testung mittels Kreuztitration) (Tabelle 3.2) mituntersucht, um so einen Vergleich mit Ergebnissen anderer Studien zu ermöglichen. Die internationalen Referenzstämme entstammten

einerseits der American Type Culture Collection (ATCC) sowie andererseits der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

Tab 3.1: Hefe–Referenzstämme im Rahmen der Breakpoint–Testung

Referenzstamm	Gattung Art	Gattung Art
	Anamorph	Teleomorph
ATCC 44374	<i>Candida albicans</i>	/
ATCC 76615	<i>Candida albicans</i>	/
ATCC 44373	<i>Candida albicans</i>	/
ATCC 90028	<i>Candida albicans</i>	/
DSMZ 11950 (Y 33.90)	<i>Candida glabrata</i>	/
ATCC 90030	<i>Candida glabrata</i>	/
ATCC 90877	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
DSMZ 11954 (Y 06.01)	<i>Candida kefyr</i>	<i>Klyveromyces marxianus</i>
ATCC 6258	<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
ATCC 90878	<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>	/
DSMZ 11955 (Y 05.01)	<i>Candida parapsilosis</i>	/
ATCC 28707	<i>Candida tropicalis</i>	/
ATCC 90874	<i>Candida tropicalis</i>	/
ATCC : American Type Culture Collection DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen () unter dieser Bezeichnung wurden die Stämme in verschiedenen internationalen Studien geführt. / Teleomorph z. Zeit nicht bekannt		

Im Rahmen dieser Arbeit werden für die Hefen die Namen des Anamorphs, also der ungeschlechtlichen Wachstumsform verwendet. Dies gilt auch dann, wenn wie bei *C. krusei* das Teleomorph *Issatchenkia orientalis* bekannt ist (Tab.3.1).

Vor Durchführung der Versuche wurden die Hefestämme aus einem modifizierten Mikrobanksystem tiefgefroren entnommen und auf Kimmig–Agar für 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Außerdem wurden alle Stämme für

eventuelle Folgeuntersuchungen weiterhin in dem oben genannten Mikrobanksystem archiviert.

Tab. 3.2: Hefe–Referenzstämme für die Kombinationstestung mittels Kreuztitration

Referenzstamm	Gattung Art
ATCC 24433	<i>Candida albicans</i>
ATCC 36801	<i>Candida albicans</i>
ATCC 44373	<i>Candida albicans</i>
ATCC 90028	<i>Candida albicans</i>
ATCC 90030	<i>Candida glabrata</i>
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>
ATCC 6258	<i>Candida krusei</i>
	(Teleomorph: <i>Issatchenkia orientalis</i>)
ATCC 28707	<i>Candida tropicalis</i>
ATCC 750	<i>Candida tropicalis</i>
ATCC 90874	<i>Candida tropicalis</i>
ATCC : American Type Culture Collection	

Für sämtliche Hefestämme konnten auswertbare Ergebnisse erzielt werden. Bedingt durch die Fragestellung der Arbeit bildete die Spezies *Candida tropicalis* einschließlich der Referenzstämme mehr als 93 % des Gesamtkollektives; weiterhin wurden, genannt in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit, die Hefearten *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr* und *Candida guilliermondii* untersucht.

3.1.2 Nährmedien

Als Nährboden für die Vorkulturen wurde Kimmig-Agar (Merck, Darmstadt, # 5414) verwendet.

Im Rahmen der verschiedenen Empfindlichkeitstestungen wurden nachfolgende flüssige Nährmedien eingesetzt:

- RPMI 1640 (Sigma RPMI1640 Medium # 7755) supplementiert auf 2,0 % Glucose
- RPMI 1640 (Sigma RPMI1640 Medium # 7755) supplementiert auf 0,2 % Glucose
- Yeast Sensitivity Testmedium (YST-Lösung, Sifin TN1283)

Tab. 3.3 *Candida tropicalis*-Stämme, getestet in zwei Nährmedien

Stamm-Nr.	Material	Einsender
My 862 II/ 99	Drainage rechts	Transplantationsmedizin
My 892/ 99	Drainage rechts	Transplantationsmedizin
My 1106/ 99I	Trachealsekret	Med. Intensivtherapie
My 1108/ 99	Rachenabstrich	Med. Intensivtherapie
My 3633 II/ 99	Stuhl	Haemato-Onkologie
My 548 II/ 99	Abstrich	Allgemeine Chirurgie
My 1154/ 99	Sputum	Raphaelsklinik
My 4325/ 99	Trachealsekret	Neurologie
My 5429 II/ 99	Abstrich	Rechtsmedizin
My 7478/ 99I	Rachen- Abstrich	Dermatologie
My 14321/ 98	Magensaft	Kinderklinik Intensiv
My 14322 I/ 98	Abstrich	Hals-Nasen-Ohren Amb.
My 7267 II/ 99	Urin	Med. Intensivtherapie
My 5122/ 98	Rachen-Abstrich	Chirurg. Intensivtherapie
My 6509 II/ 98	Mund-Abstrich	Med. Poliklinik
My 6994/ 98	Stuhl	Med. Poliklinik
My 12617/ 98	Abstrich	Transplantationsmedizin
My 10827 III/ 98	Anal-Abstrich	Med. Intensivtherapie
My 10851/ 98	Magensaft	Med. Intensivtherapie
My 11000/ 98	Stuhl	Strahlentherapie
My 12490 I/ 98	Anal-Abstrich	Med. Intensivtherapie
My 14341/ 98	Nase	Transplantationsmedizin
My 10853/ 98	Anal-Abstrich	Med. Intensivtherapie
My 10874/ 98	Abstrich	Chirurg. Intensivtherapie
My 11403/ 98	Trachealsekret	Neurologie
My 12542 I/ 98	Stuhl	Med. Intensivtherapie
Mx 367/ 99I	Blutkultur	Med. Intensivtherapie
My 14320/ 98	Rachen-Abstrich	Transplantationsmedizin
My 12489 I / 98	Trachealsekret	Med. Intensivtherapie

Als Puffer diente bei den RPMI1640-Medien MOPS-Puffer.

In den Breakpointtestungen wurde als Nährmedium RPMI1640 2,0 % Glucose verwendet.

Im Rahmen der Kombinationstestungen mittels Kreuztitration erfolgte die Empfindlichkeitstestung der Referenz- und Kontrollstämme sowie der in Tabelle 3.4 genannten *Candidia tropicalis*-Isolate jeweils in den Nährmedien RPMI1640 2,0 % Glucose und in YST-Medium.

3.1.3 Antimykotika

Im Rahmen der Breakpointtestungen wurde die Empfindlichkeit gegenüber zwei Azol-Antimykotika (Fluconazol, Voriconazol) und gegenüber Flucytosin (5-Fluorocytosin) in folgenden Konzentrationen untersucht:

1. Fluconazol, Konzentrationen 4 µg/ml, 8 µg/ml, 25 µg/ml
2. Voriconazol, Konzentrationen 0,125 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml und
3. Flucytosin, Konzentrationen 1 µg/ml, 4 µg/ml, 25 µg/ml.

Die Auswahl der Antimykotikakonzentrationen erfolgte u.a. unter Berücksichtigung klinisch-pharmakologischer Aspekte. So wird unter der üblichen Dosierung von Flucytosin (150 mg/kg) im Glaskörper des Auges eine Konzentration von 5 µg/ml erzielt, während bei einer heute schon als niedrig erachteten Tagesdosis von 200 mg Fluconazol eine Liquorkonzentration von etwa 4 µg/ml (entsprechend 70 % des Serumspiegels) beobachtet wird (PITTROW und PENK 1996).

In der zweiten Untersuchungsphase, in der die Empfindlichkeit von *C. tropicalis*-Isolaten mit besonderen Empfindlichkeitsmustern gegenüber Fluconazol und Flucytosin allein und in Kombination mittels Kreuztitration

vergleichend untersucht wurde, kamen die nachfolgenden Antimykotikakonzentrationen zum Einsatz:

1. Fluconazol, Konzentrationen 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml und
2. Flucytosin, Konzentrationen 0,0625 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml sowie
3. die jeweiligen Konzentrationen der beiden Antimykotika in Kombination (siehe Abb. 3.2)

Die Untersuchungen mittels Kreuztitration wurden in den Medien YST, RPMI 1640 2,0 % Glucose und RPMI 1640 0,2 % Glucose durchgeführt, wobei bei den in Tab. 3.4 aufgeführten klinischen Isolaten nur die beiden ersten Medien zum Einsatz kamen.

3.1.4 Mikrotiterplatten

Bei den Empfindlichkeitsbestimmungen mittels Mikrodilutionsverfahren wurden „MICRONAUT-AM“-Platten der Firma MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel verwendet. Hierbei handelt es sich um sterile 96 Loch-Kunststoff-Mikrotiterplatten, deren Vertiefungen mit den der Fragestellung entsprechenden Antimykotikakonzentrationen beschickt sind.

Für die Breakpointtestungen wurde die MICRONAUT-AM (Katalog-Nr. E1-803-001, Design vom 22.10.1998) verwendet, wohin gegen die Kreuztitrationen in der MICRONAUT-AM-Kreuztitrationsplatte FCY/FLC (Katalog-Nr. E1-806-001, Design vom 28.02.2000) vorgenommen wurden.

3.1.5 Photometer

Zur Dokumentation und Kontrolle der visuellen Auswertung wurden die Versuchsansätze mittels eines Flow Titertek Multiskan MCC/340-Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm spektrophotometrisch gemessen. Die

Messung erfolgte gegen den Leerwert. Als Obergrenze des ausgewerteten Messbereichs wurde eine optische Dichte von 0,75 gewählt. In Vorversuchen wurde der Klassifizierungsrahmen so ermittelt, dass die Klasse „1“ keine Trübung bei einer visuellen Ablesung zeigte und damit den Anforderungen der klassischen Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) entsprach.

3.2 Methode

Gemäß den Fragestellungen ergaben sich zwei unterschiedliche Untersuchungsphasen.

In der ersten Untersuchungsphase wurden 273 klinische *C. tropicalis*-Isolate und 14 Kontrollstämme (Tab. 3.2) mittels des Breakpoint-Tests auf ihr Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Fluconazol (FLC), Voriconazol (VOR) und Flucytosin (FCY) untersucht.

In einer zweiten Untersuchungsphase wurde dann von 29 *C. tropicalis*-Isolaten mit speziellen Resistenzmustern (Tab. 3.3) sowie von 10 Referenz-Hefestämmen (Tab. 3.2) mittels Kreuztitration (Checkerboard-Technik) das Empfindlichkeitsverhalten bei gleichzeitigem Einwirken von FLC und FCY in unterschiedlichem Konzentrationsverhältnis analysiert.

3.2.1 Erstellung des Inokulums

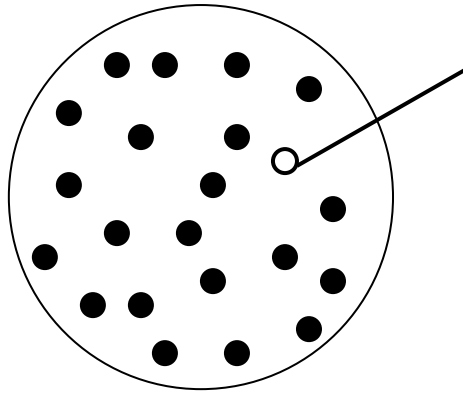
Von den auf Kimmig-Agar in Reinkultur vorliegenden 24 Stunden alten Hefekolonien wurden jeweils mit einer sterilen Impföse zur Breakpoint-Testung 5, zur Kreuztitration-Untersuchung 3 Kolonien von $>1 \text{ mm} \leq 2 \text{ mm}$ Durchmesser aufgenommen und zur Herstellung einer Keimsuspension in ein Glasröhrchen mit 4900 μl des jeweils verwendeten Nährmediums gebracht.

Nach fünfzehnsündiger Aufwirbelung mit einem Vortex-Gerät wurden 100 μl dieser Suspension erneut in 4900 μl des jeweiligen Mediums gegeben und gevortext, womit das gebrauchsfertige Inokulum mit einer Verdünnung von 1:50 vorlag.

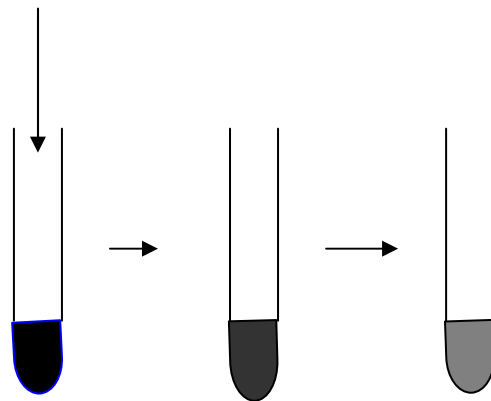
Bei jedem fünften zufällig ausgewählten Hefestamm und den Referenzstämmen wurde die Keimzahl dieser Inokulumlösung bestimmt. Dazu wurden von der gebrauchsfertigen Keimsuspension 10 µl mit einer Pipette aufgenommen und auf Kimmig–Agar ausgestrichen. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und die Keimzahl pro Milliliter Inokulum berechnet.

Mit jedem untersuchten Hefestamm wurde auf die oben beschriebene Art viermal verfahren.

Abb. 3.1 Erstellen des Inokulum für den Breakpoint-Test (BPT) und die Kreuztitrationstestung sowie der Aufbau eines BPT



Inokulumherstellung:
 Drei bzw. fünf > 1 mm ≤ 2 mm große, 24 Stunden alte Hefekolonien werden in 5 ml Medium gebracht und 1:50 verdünnt.
 Die Antimykotika-Testplatten werden in Phase 1 und 2 mit dem fertigen Inokulum beimpft und über 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C inkubiert.



Phase 1:	Fluconazol		Voriconazol		Flucytosin					
Breakpoint- Testung (Photometrie nach 24/48 h)	○ Kontr.	●	●	●	●	○	●	○	○	
		4	8	25	0,125	0,5	1	1	4	25
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml

3.2.2 Breakpoint–Testung (Untersuchungsphase 1)

Zur Durchführung des Breakpoint–Tests (Abb. 3.1) wurden für jeden Hefestamm der 14 Kontrollkeime und der 273 *C. tropicalis*–Stämme jeweils 10 Öffnungen der Mikrotiterplatte Micronaut–AM; E1–8003–001 mit 200 µl des entsprechenden Inoculums beschickt, so dass sich folgendes Muster ergab:

1. Öffnung A: 200 µl Inoculum (Wachstumskontrolle)
2. Öffnung B: 200 µl Inoculum in Fluconazol (Konzentration 4,0 µg/ml)
3. Öffnung C: 200 µl Inoculum in Fluconazol (Konzentration 8,0 µg/ml)
4. Öffnung D: 200 µl Inoculum in Fluconazol (Konzentration 25,0 µg/ml)
5. Öffnung E: 200 µl Inoculum in Voriconazol (Konzentration 0,125 µg/ml)
6. Öffnung F: 200 µl Inoculum in Voriconazol (Konzentration 0,5 µg/ml)
7. Öffnung G: 200 µl Inoculum in Voriconazol (Konzentration 1,0 µg/ml)
8. Öffnung H: 200 µl Inoculum in Flucytosin (Konzentration 1,0 µg/ml)
9. Öffnung I: 200 µl Inoculum in Flucytosin (Konzentration 4,0 µg/ml)
10. Öffnung J: 200 µl Inoculum in Flucytosin (Konzentration 25,0 µg/ml)

Zur Leerwertmessung und als Sterilkontrolle wurde zudem auf jeder Mikrotiterplatte eine Öffnung mit 200 µl RPMI 2 % Glucose–Medium ohne Zugabe von Inokulum beschickt.

Die Untersuchungen wurden als Doppelansätze durchgeführt.

3.2.3 Inkubation und Ablesung

Die in oben beschriebener Weise fertig beschickten Mikrotiterplatten wurden in einer feuchten Kammer bei 37° C inkubiert.

Nach 24 und 48 Stunden erfolgte eine visuelle und photometrische Ablesung. Hierfür wurde jede Mikrotiterplatte zur Sedimentdurchmischung für jeweils fünf Minuten auf einen Rüttler (VARI-SHAKER der Fa. Dynatech, 700–800 U/ min) gestellt. Nach Entfernung des kondensierten Wassers auf der Unterseite der Mikrotiterplatte wurde die in dem jeweiligen Zeitraum erfolgte Absorption als Maß für das Keimwachstum mittels Photometer (Titertek Multiskan MCC/340) bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Zusätzlich erfolgte eine visuelle Ablesung. Eventuelle Abweichungen wurden protokollarisch festgehalten.

Als minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde die jeweils niedrigste Konzentration des betreffenden Antimykotikums festgelegt, bei der visuell keine Trübung erkennbar war und deren Messung einen Photometerwert von „0“ ergab.

3.2.4 Kreuztitrationstestung (Untersuchungsphase 2)

In dieser Untersuchungsphase ging es darum, initiale Informationen einerseits über das Empfindlichkeitsverhalten bei gleichzeitiger Einwirkung von zwei Antimykotika in unterschiedlichen Konzentrationskombinationen zu untersuchen und andererseits darum, Methoden der Auswertung und Bewertung zu erproben und zu hinterfragen.

Als Antimykotika wurden Flucytosin und Fluconazol ausgewählt. Die Untersuchungen wurden an 10 Kontrollstämmen (Tab. 3.2) sowie 29 *C. tropicalis*-Isolaten, die in der Breakpoint-Testung ein besonderes Empfindlichkeitsmuster gezeigt hatten, durchgeführt. Von den *C. tropicalis*-Isolaten wurden aufgrund ihres zeit- bzw. antimykotikaabhängigen Resistenzverhaltens die Stämme in sieben unterschiedliche Gruppen aufgeteilt.

1. Stämme der Empfindlichkeitsklasse **C** nur gegen Flucytosin nach 24 h
2. Stämme der Empfindlichkeitsklasse **C** nur gegen Flucytosin nach 48 h
3. Stämme der Empfindlichkeitsklasse **C** nur gegen Fluconazol nach 24 h
4. Stämme der Empfindlichkeitsklasse **C** nur gegen Fluconazol nach 48 h
5. Stämme der Empfindlichkeitsklasse **C** gegen Fluconazol und Flucytosin nach 24 h
6. Stämme der Empfindlichkeitsklasse **C** gegen Fluconazol nach 48 h und gegen Flucytosin nach 24 h

Aus diesen 6 Gruppen wurden wiederum insgesamt 29 Stämme ausgewählt. Die Untersuchungen wurden für zehn Referenz-Hefestämme und die *C. tropicalis*-Isolate sowohl in RPMI 2,0 % Glucose und YST-Medium durchgeführt. In Vorversuchen hatten sich zwischen den beiden RPMI-Medien (RPMI 2,0 % Glucose, RPMI 0,2 % Glucose) keine relevanten Unterschiede ergeben.

Testdurchführung:

Die Erstellung des Inokulums erfolgte auf die gleiche Weise wie unter 3.2.1 für den BPT beschrieben. Verwendet wurde die Kreuztitrationsplatte FCY/FLC (Micronaut-AM E1-806-001, Fa. Merlin). Jede Öffnung wurde mit 200 µl des Inokulums beschickt.

Abb. 3.2 Aufbau der **Kreuztitrationsplatte**

Fluconazol (FLC) versus Flucytosin (FCY) (Micronaut-AM E1-806-001, Fa. Merlin), alle Konzentrationsangaben in mg/l, Öffnung A1: Wachstumskontrolle, Spalte 12 diverse Kontrollen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kontr.	FCY/ 32	FCY/ 16	FCY/ 8	FCY/ 4	FCY/ 2	FCY/ 1	FCY/ 0,5	FCY/ 0,25	FCY/ 0,125	FCY/ 0,0625	Kontr.
B	FLC 32	FCY/ FLC 32/32	FCY/ FLC 16/32	FCY/ FLC 8/32	FCY/ FLC 4/32	FCY/ FLC 2/32	FCY/ FLC 1/32	FCY/ FLC 0,5/32	FCY/ FLC 0,25/32	FCY/ FLC 0,125/32	FCY/ FLC 0,0625/32	Kontr.
C	FLC 16	FCY/ FLC 32/16	FCY/ FLC 16/16	FCY/ FLC 8/16	FCY/ FLC 4/16	FCY/ FLC 2/16	FCY/ FLC 1/16	FCY/ FLC 0,5/16	FCY/ FLC 0,25/16	FCY/ FLC 0,125/16	FCY/ FLC 0,0625/16	Kontr.
D	FLC 8	FCY/ FLC 32/8	FCY/ FLC 16/8	FCY/ FLC 8/8	FCY/ FLC 4/8	FCY/ FLC 2/8	FCY/ FLC 1/8	FCY/ FLC 0,5/8	FCY/ FLC 0,25/8	FCY/ FLC 0,125/8	FCY/ FLC 0,0625/8	Kontr.
E	FLC 4	FCY/ FLC 32/4	FCY/ FLC 16/4	FCY/ FLC 8/4	FCY/ FLC 4/4	FCY/ FLC 2/4	FCY/ FLC 1/4	FCY/ FLC 0,5/4	FCY/ FLC 0,25/4	FCY/ FLC 0,125/4	FCY/ FLC 0,0625/4	Kontr.
F	FLC 2	FCY/ FLC 32/2	FCY/ FLC 16/2	FCY/ FLC 8/2	FCY/ FLC 4/2	FCY/ FLC 2/2	FCY/ FLC 1/2	FCY/ FLC 0,5/2	FCY/ FLC 0,25/2	FCY/ FLC 0,125/2	FCY/ FLC 0,0625/2	Kontr.
G	FLC 1	FCY/ FLC 32/1	FCY/ FLC 16/1	FCY/ FLC 8/1	FCY/ FLC 4/1	FCY/ FLC 2/1	FCY/ FLC 1/1	FCY/ FLC 0,5/1	FCY/ FLC 0,25/1	FCY/ FLC 0,125/1	FCY/ FLC 0,0625/1	Kontr.
H	FLC 0,5	FCY/ FLC 32/0,5	FCY/ FLC 16/0,5	FCY/ FLC 8/0,5	FCY/ FLC 4/0,5	FCY/ FLC 2/0,5	FCY/ FLC 1/0,5	FCY/ FLC 0,5/0,5	FCY/ FLC 0,25/0,5	FCY/ FLC 0,125/0,5	FCY/ FLC 0,0625/0,5	Kontr.

Jede Mikrotiterplatte enthielt sich geometrisch um den Faktor 2 verringerte Konzentrationen von Flucytosin in der Horizontalen und von Fluconazol in der Vertikalen. Damit ergaben sich in jedem zu untersuchenden Feld der Mikrotiterplatte unterschiedliche Konzentrationen und Kombinationen der beiden Antimykotika Fluconazol und Flucytosin (Abb 3.2).

Wie bei der Breakpointtestung wurde bei jedem der untersuchten Hefestämme eine Wachstumskontrolle für jedes Antimykotikum und eine Leerwertkontrolle mitgeführt.

Die mit Inokulum beimpften Testplatten wurden daraufhin wie schon in 3.2.2 beschrieben über nun insgesamt 72 Stunden bei 37° C in einer feuchten

Kammer inkubiert und das Wachstumsverhalten nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden visuell und photometrisch ausgewertet. Für jeden Hefestamm wurde so die minimale Hemmkonzentration dem einzelnen Antimykotikum als auch der Antimykotikakombination gegenüber bestimmt.

3.2.5 Methoden der Auswertung

3.2.5.1 S–I–R–Klassifikation

Pharmakologische Unterschiede sowie Unterschiede in den Wirkmechanismen der einzelnen Antimykotika führen u.a. dazu, dass ein unmittelbarer Vergleich der MHK–Werte der Antimykotika nicht möglich ist. Aus diesem Grunde werden die Mikroorganismen aufgrund ihrer MHK–Werte in die Sensibilitätsklassen (SC): „Sensibel“, „Intermediär“ und „Resistent“ (S–I–R–Klassifikation) eingestuft.

Die Grenzen dieser Sensibilitätsklassen (Breakpoints) sind für jedes Antimykotikum aus den oben erwähnten Gründen unterschiedlich und sind in unterschiedlichen Protokollen oder Normen festgelegt (u.a. NCCLS M27–A2, DIN 58940–84). Nicht für alle systemisch einsetzbaren Antimykotika gibt es zurzeit international einheitliche Breakpoints, wie die Tabelle 3.4 zeigt.

Tab. 3.4: Grenzwerte der S–I–R–Sensibilitätsklassen

Sensibilitätsklasse	Sensibel	Intermediär	Resistent
Antimykotikum	mg / l	mg / l	mg / l
FCY ¹	≤4,0	> 4 - < 32	≥ 32
AmB ²	≤ 0,25	> 0,25 - < 1	≥ 1
KET ²	≤ 1	> 1 - < 4	≥ 4
FCL ¹	≤ 8,0	> 8 - < 64	≥ 64
VOR ³	≤1,0	> 1 - < 4	≥ 4
ITR ¹	≤ 0,125	> 0,125 - < 1	≥ 1
FCY = Flucytosin AmB = Amphotericin B KET = Ketoconazol FCL = Fluconazol VOR = Voriconazol ITR = Itraconazol			
¹ NCCLS M27 A2 ² in Diskussion ³ CLSI tentative 01/2005			

3.2.5.2 A–B–C–Klassifizierung

Da gemäß der Zielsetzung des BPT als Such–Test für „Stämme mit einer verminderten Empfindlichkeit“ die ausgewählten Grenzwerte nicht mit denen des NCCLS M27–A2–Protokolls oder des DIN 58940–84 übereinstimmten und die Konzentrationen keiner geometrischen Verdünnungsreihe entsprechen, wird zum Unterschied zur S–I–R–Klassifizierung von Empfindlichkeitsklassen (EC) mit den Buchstaben „A, B und C“ gesprochen. Die Klasse EC–A wurde dabei noch einmal für besondere Untersuchungen in die Klassen EC–A1 und EC–A2 unterteilt.

Tab.3.5 A–B–C–Empfindlichkeitsklassen und ihre Klassengrenzen für die vergleichende Bewertung der Ergebnisse der Breakpoint–Tests (BPT)

Empfindlichkeits- -klasse (EC) Im BPT		Resistenz- verhalten	Konzentrationsangaben der Klassengrenzen (µg/ml)		
			qualitativ	FLC	VOR
A	A 1	Hoch- Sensibel	≤ 4	≤ 0,125	≤ 1
	A 2	Sensibel	8	0,5	4
B		Intermediär	25	1	25
C		BP–Resistent	> 25	> 1	> 25

FLC = Fluconazol **VOR** = Voriconazol **FCY** = Flucytosin

In einem nächsten Schritt wurde eine neue Klassifizierung nach gezeigter Änderung im Wachstumsverhalten eingeführt.

Diejenigen Stämme, die nach 48 Stunden derselben Klasse wie nach 24 Stunden zugehörig waren, wurden als solche bezeichnet, die ein „Standing“ gegenüber einem Antimykotikum vollzogen hatten.

Ein „Climbing“ zeigten die Stämme, die nach 48 Stunden eine Codierungsstufe höher als nach 24 Stunden eingestuft wurden.

Als „Jumping“ wurde ein Verhalten betrachtet, bei dem der betreffende Candida–Stamm einen Unterschied von mehr als einer Codierungsstufe aufwies (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6 Art der Veränderung des Empfindlichkeitsverhaltens

Art der Veränderung	Empfindlichkeit nach 24h/48h			
	A 1/ A 1	A 2/ A 2	B/ B	C/ C
Standing	A 1/ A 1	A 2/ A 2	B/ B	C/ C
Climbing	A 1/ A 2	A 2/ B	B/ C	
Jumping	A 1/ B	A 1/ C	A 2 / C	

3.2.6 Fractional Inhibitory Concentration–Index (FIC–Index)

Benutzt man denselben Untersuchungsaufbau, so ist es bei der Kreuztitration möglich, auch zwei oder mehrere Medikamente einzeln oder in Kombination gegeneinander zu testen und zu quantifizieren.

Der Fractional Inhibitory Concentration–Index (FIC–Index) kann als mathematisches Hilfsmittel zur Quantifizierung verwendet werden. Damit stellt der FIC–Index die in der Literatur meist verwendete Methode dar, Studienergebnisse unter Verwendung von antimikrobiellen Kombinationen zu beschreiben (LORIAN 1996).

Die Fractional Inhibitory Concentration ist für jedes Medikament als Quotient aus der Konzentration des betreffenden Medikamentes, die in einer bestimmten Untersuchungsreihe zur Wachstumshemmung notwendig ist, mit der MHK dieses Medikamentes allein gegen den Testorganismus definiert. Den FIC–Index berechnet man dann durch Summation der einzelnen FIC–Werte wie folgt:

FIC-Wert = Quotient der MIC von A in Kombination (MIC-Ac) geteilt durch MIC-A allein:

$$\text{FIC-A} = \text{MIC-Ac} / \text{MIC-Aa.}$$

FIC-Index = Summe der FIC-Werte der einzelnen Substanzen der Kombination A plus B:

$$\text{FIC-Index A+B} = \text{FIC-A} + \text{FIC-B.}$$

Der erhaltene quantitative Indexwert erlaubt eine qualitative Bewertung der Kombination für das Isolat durch die Zuordnung zu einer der vier qualitativen Verhaltensmuster des FIC-Index: Synergismus (FIC-Index $\leq 0,5$), Additives Verhalten (FIC-Index $> 0,5 - \leq 1,0$), Indifferentes Verhalten (FIC-Index $> 1 - \leq 2,0$) sowie Antagonismus (FIC-Index $\geq 2,0$).

4 Ergebnisse der eigenen Untersuchungen

4.1 Ergebnisse des Breakpoint – Tests (BPT)

Alle verwendeten Hefestämme konnten in die Auswertung einfließen, da die Wachstumskontrollen stets als positiv zu bewerten waren und die durchgeführten Sterilkontrollen negativ blieben.

Im Nachfolgenden wird auf die Breakpoint–Ergebnisse der 273 klinischen *C. tropicalis*–Isolate sowie der 14 Kontrollstämmen eingegangen. Auf der Grundlage der Breakpoint–MHK, definiert als die niedrigste untersuchte Konzentration eines Antimykotikums, die das Keimwachstum inhibiert, erfolgte eine qualitative Bewertung gemäß der in der Tab. 3.5 beschriebenen A–B–C–Klassifizierung der Empfindlichkeitsklassen (EC) in „sensibel“ (EC–A), „intermediär“ (EC–B) sowie „BP – resistent“ (EC–C).

4.1.1 Verteilung der MHK im Breakpoint–Test nach 24 und 48 Stunden in der A–B–C–Klassifizierung der *C. tropicalis*–Isolate

Insgesamt zeigte sich für die 273 untersuchten *C. tropicalis*–Isolate, dass in der Testung gegenüber Fluconazol und Voriconazol nach 24 Stunden der Schwerpunkt der Breakpoint–MHK in der Empfindlichkeitsklasse (EC) EC–A lag: 93,4 % der untersuchten Stämme besaßen eine MHK von ≤ 8 mg/L gegenüber Fluconazol, bei 91,6 % aller Stämme konnte gegenüber Voriconazol eine MHK von $\leq 0,5$ mg/L nachgewiesen werden. Nach 48 Stunden wiesen immer noch mehr als $\frac{3}{4}$ aller gegenüber Fluconazol getesteten Stämme (81,0 %) eine MHK von ≤ 8 mg/L auf; 6,2 % der Stämme waren der EC–B (MHK $> 4 - < 25$ mg/L), 12,8 % der Stämme der EC–C (MHK ≥ 25 mg/L) zuzuordnen.

Gegenüber Voriconazol waren nach 48 Stunden allerdings nur noch die Hälfte aller Stämme (49,5 %) in die EC–A mit einer MHK von $\leq 0,5$ mg/L einzuordnen. 23,1 % der Stämme gehörten dagegen der EC–B (MHK $> 0,5 - < 1$ mg/L) an, und 27,5 % besaßen eine Breakpoint–MHK von ≥ 1 mg/L (EC–C).

Gegenüber Flucytosin lag der Schwerpunkt sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden in den EC–A und EC–C. Die Hälfte der untersuchten Stämme hatten im untersuchten Zeitraum eine MHK im Breakpointtest von ≤ 4 mg/L (EC–A). Eine MHK von ≥ 25 mg/L (EC–C) besaßen gegenüber Flucytosin nach 24 Stunden 29,7 % der Isolate, nach 48 Stunden stieg der Anteil auf 41,4 % an.

Tab. 4.1: Verteilung der numerischen und prozentualen Häufigkeit der BPT–MHK–Ergebnisse der *C. tropicalis*–Isolate in der A–B–C–Klassifizierung nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubationszeit
Gesamtanzahl der untersuchten Stämme: n = 273 = 100 %

Antimykotikum	Empfindlichkeitsklasse											
	A				B				C			
	24 h		48 h		24 h		48 h		24 h		48 h	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Flucytosin	154	56,4	151	55,3	38	13,9	9	3,3	81	29,7	113	41,4
Fluconazol	255	93,4	221	81,0	4	1,5	17	6,2	14	5,1	35	12,8
Voriconazol	250	91,6	135	49,5	8	2,9	63	23,1	15	5,5	75	27,5

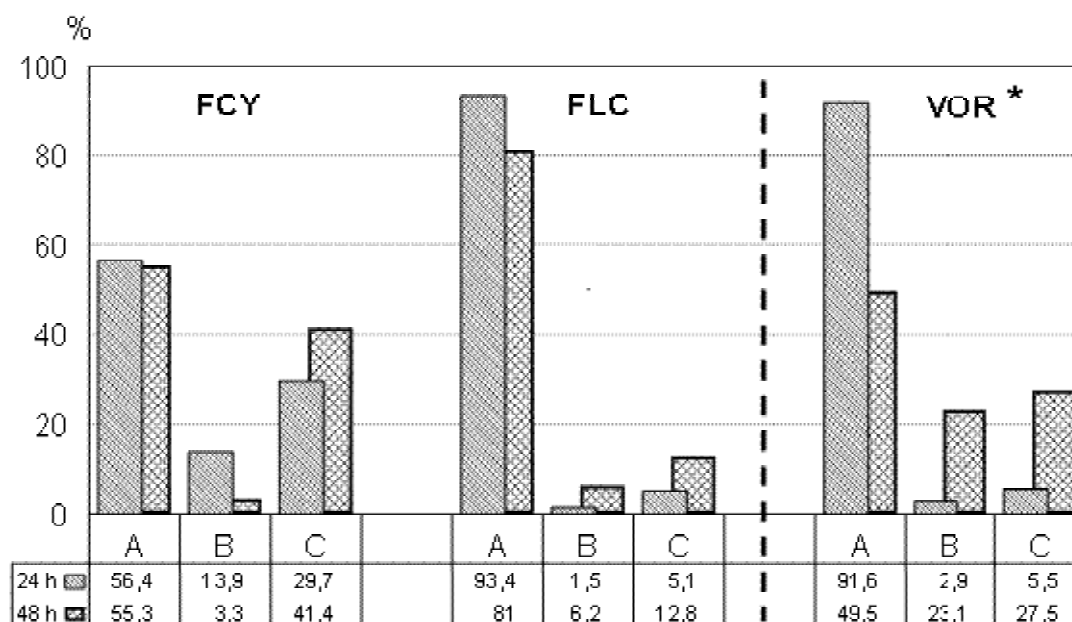
Damit besaß nach 24 Stunden schon nahezu jeder dritte Stamm und nach 48 Stunden annähernd jeder zweite Stamm gegenüber diesem Antimykotikum eine MHK ≥ 1 mg/l. Gegenüber Flucytosin fand sich somit für die *C. tropicalis*–Isolate eine bimodale Empfindlichkeitsverteilung mit einer besonders starken Ausprägung nach 48 Stunden Inkubationszeit (Abb. 4.1).

Ein anderes Bild zeigte sich beim Empfindlichkeitsmuster gegenüber Fluconazol und Voriconazol. Hier waren nach 24 Stunden nur etwa 5 % der untersuchten Stämme BP–resistent. Nach 48 Stunden stieg der Anteil von Voriconazol–BP–resistenten Stämmen auf 27,5 %. Gegenüber Fluconazol waren nach demselben Zeitraum hingegen nur 12,8 % der Proben als BP–resistent zu betrachten (Tab. 4.1).

Die zeitlich bedingten Veränderungen der BP–MHK–Häufigkeiten in den einzelnen Empfindlichkeitsklassen erwiesen sich mit Ausnahme der EC–A von Flucytosin als signifikant (Tab. 4.1, Abb. 4.1).

Die **Ergebnisse für Voriconazol** sind nach heutigem Kenntnisstand **nur als bedingt aussagefähig** zu betrachten. Nach Abschluss der Untersuchungen wurden im Jahr 2005 vom Clinical Laboratory Standardisation Institute (CLSI) vorläufige Breakpoints für Voriconazol veröffentlicht, die zeigen, dass die in dieser Untersuchung verwendeten Breakpoints des BPT mit der A–B–C–Klassifizierung in den Klassen B und C deutlich zu niedrig liegen. In der Diskussion der Ergebnisse wird hierauf näher eingegangen.

Abb. 4.1 : Prozentuale Verteilungsmuster auf die Breakpoint-Empfindlichkeitsklassen von 273 *C.tropicalis* Isolaten nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit gegenüber Flucytosin (FCY), Fluconazol (FLC) und Voriconazol (VOR)



* nur bedingt aussagefähig, siehe Text.

4.1.2 Zeitabhängige Veränderungen der Verteilung der MHK innerhalb der Empfindlichkeitsklasse A

Für die Frage nach einem präselektiven Ausschluss eines Isolates von weiteren Empfindlichkeitsuntersuchungen wurden die Isolate der Empfindlichkeitsklasse A anhand ihrer BP–MHK in die Klassen „hochsensibel“ (EC–A1) und „sensibel“ (EC–A2) aufgeteilt (Tab. 4.2).

Von der Gesamtzahl aller untersuchten Stämme (n = 273) gehörten bei der Testung von Fluconazol 87,2 % nach 24 Stunden bzw. 65,2 % nach 48 Stunden

der EC–A1 an. Bei der Empfindlichkeitstestung gegenüber Voriconazol waren nach 24 Stunden 57,1 % der Stämme als hochsensibel einzuordnen, jedoch nach 48 Stunden nur noch 15,8 %. Gegenüber Flucytosin konnten sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden ca. die Hälfte aller untersuchten Stämme der EC–A1 zugeordnet werden (Tab. 4.2).

Der Anteil der *C. tropicalis*–Stämme, die zur EC–A1 gehörten, variierte somit sowohl in Abhängigkeit von der Art des Antimykotikums als auch von der Inkubationszeit.

Geordnet nach der prozentualen Häufigkeit der EC–A1 am Gesamtkollektiv ergab sich die nachfolgende Reihung:

nach 24 h : FLC (87,2 %) > VOR (57,1 %) > FCY (53,1 %) ;
nach 48 h : FLC (65,2 %) > FCY (50,9 %) >> VOR (15,8 %).

Die geringste zeitabhängige Veränderung (24 h / 48 h) fand sich bei Flucytosin mit einer Verminderung um 2,2 %, wohin gegen die größte Verminderung in der EC–A1 bei Voriconazol mit 41,3 % zu finden war.

Ein direkter Vergleich der EC–A1 und EC–A2 in Bezug auf die zeitlichen Veränderungen kann nicht erfolgen, da, wie Ergebnisanalysen zeigen, auch inkubationszeitabhängig ein Wechsel in eine der anderen beiden Empfindlichkeitsklassen (EC–B, EC–C) erfolgen kann.

So zeigte sich, dass ein Wechsel von der EC–A1 zu EC–C für die einzelnen Antimykotika in unterschiedlichen Ausmaß erfolgte: Fluconazol (6,3 %), Voriconazol (11,4 %) und Flucytosin (0,7 %).

Tab. 4.2: Numerische und prozentuale Verteilung der Empfindlichkeitsklassen A, A1 und A2 auf der Basis der 273 *C. tropicalis*-Isolate (100 %) im Breakpointtest

Antimykotikum	<u>Empfindlichkeitsklasse</u>											
	A				A1				A2			
	24 h		48 h		24 h		48 h		24 h		48 h	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Flucytosin	149	54,6	145	53,1	147	53,8	139	50,9	2	0,8	6	2,2
Fluconazol	254	93,1	214	78,4	238	87,2	178	65,2	16	5,9	36	13,2
Voriconazol	246	90,1	129	47,3	156	57,1	43	15,8	90	33,0	86	31,5

Wird die Zugehörigkeit zur EC–A1 als Ausschlusskriterium für hochempfindliche Keime von weiteren Empfindlichkeitsuntersuchungen gewählt, so sollten hierfür die Werte nach 48 Stunden Inkubationszeit zugrunde gelegt werden.

4.1.3 Breakpoint-Testergebnisse der 14 Kontrollstämme

Analysiert wurde auch das Empfindlichkeitsverhalten der 14 Kontrollstämme gegenüber den Antimykotika Flucytosin, Fluconazol und Voriconazol nach 24 Stunden und nach 48 Stunden.

Lediglich fünf der untersuchten Hefe-Kontrollstämme waren gegenüber einem bzw. mehreren Antimykotika in die EC–C einzuordnen und somit nach den Beurteilungsgrundsätzen des BPT als „BP-resistent“ einzustufen. Die übrigen Hefestämme erwiesen sich gegenüber den getesteten Antimykotika als sensibel (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Empfindlichkeitsverhalten der 14 Kontrollstämme gegenüber Flucytosin (FCY), Fluconazol (FLC) und Voriconazol (VOR) nach der A–B–C–Klassifizierung

Stamm	Gattung/Art	FCY		FLC		VOR	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	A	A	A	C	A	B
ATCC 90878	<i>C. krusei</i>	B	B	C	C	C	C
ATCC 90874	<i>C. tropicalis</i>	C	C	A	A	A	B
ATCC 28707	<i>C. tropicalis</i>	A	A	A	A	A	A
DSMZ 11954	<i>C. kefyr</i>	A	A	A	A	A	A
DSMZ 11950	<i>C. glabrata</i>	A	A	A	A	A	B
ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	A	A	A	C	A	B
ATCC 44374	<i>C. albicans</i>	A	A	A	A	A	A
ATCC 76615	<i>C. albicans</i>	A	C	A	A	A	A
ATCC 44373	<i>C. albicans</i>	A	B	A	A	A	A
ATCC 90028	<i>C. albicans</i>	A	B	A	A	A	A
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	A	A	A	A	A	A
DSMZ 11955	<i>C. parapsilosis</i>	A	A	A	A	A	A
ATCC 90877	<i>C. guilliermondii</i>	A	A	A	A	A	B

FCY = Flucytosin **FLC** = Fluconazol **VOR** = Voriconazol

Drei der fünf oben genannten Stämme waren gegenüber Fluconazol BP–resistent, ein Stamm gegenüber Voriconazol und zwei Stämme gegenüber Flucytosin.

C. parapsilosis, *C. kefyr* und *C. guilliermondii* waren in der Breakpointtestung insgesamt sensibel gegenüber allen getesteten Antimykotika. Einer der beiden *C. tropicalis*–Stämme (ATCC 90874) wies für Flucytosin eine primäre Resistenz auf, wohingegen der andere Kontrollstamm (ATCC 28707) gegenüber Flucytosin sensibel war.

Einen Inkubationszeit–abhängigen Wechsel von EC–A nach EC–C zeigte der *C. glabrata*–Stamm (ATCC 90030) und der *C. krusei*–Stamm (ATCC 6258) gegenüber Fluconazol sowie der *C. albicans*–Stamm (ATCC 76615) gegenüber Flucytosin. Bei dem *C. krusei*–Stamm lag sowohl eine primäre Resistenz gegenüber Fluconazol als auch gegenüber Voriconazol in der Breakpoint–Testung vor (Tab. 4.3).

4.1.4 Formen und Häufigkeitsverteilung der inkubationszeitabhängigen Empfindlichkeitsänderungen

Durch die Verlängerung der Inkubationszeit von 24 auf 48 Stunden kam es bei allen Antimykotika zu einer Veränderung der Empfindlichkeitsverteilung, die innerhalb der einzelnen Empfindlichkeitsklassen bei den einzelnen Antimykotika unterschiedlich ausgeprägt war (Tab. 4.1, Abb. 4.1).

Ausgehend von einem Vergleich der Empfindlichkeitsklasse nach 24 Stunden mit der nach 48 Stunden ließen sich drei zeitlichbedingte Verhaltensmuster aufzeigen: keine Veränderung („Standing“), Anstieg um eine Empfindlichkeitsklasse („Climbing“) oder Anstieg um mehr als eine Empfindlichkeitsklasse („Jumping“). Die entsprechenden Möglichkeiten sind in der Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tab. 4.4: Zeitlich bedingte Verhaltensmuster und ihre Definitionen anhand der A–B–C–Empfindlichkeitsklassen

Veränderung	Empfindlichkeitsklasse (EC)			
	A1	A2	B	C
Standing	A1 = A1	A2 = A2	B = B	C = C
Climbing	A1 > A2	A2 > B	B > C	/
Jumping	A1 > B, A1 > C	A2 > C	/	/

Die Zuordnung der 273 *Candida tropicalis*–Isolate der Routinediagnostik zu den drei Verhaltensmustern zeigte ein unterschiedliches Verhalten sowohl zwischen den Azolantimykotika und Flucytosin als auch im prozentualen Verhältnis zwischen den beiden Azolantimykotika.

Bezogen auf die insgesamt untersuchten Isolate entsprach bei den Azolantimykotika der Anteil der Isolate mit einem „Climbing“ (Fluconazol 7,0 %; Voriconazol 22,3 %) annähernd dem mit einem „Jumping“ (Fluconazol: 6,6 %; Voriconazol: 20,9 %). Dabei lag jedoch der Anteil der Isolate, die eine

zeitabhängige Empfindlichkeitsveränderung machten, bei Voriconazol nahezu dreimal so hoch.

Bei Flucytosin hingegen überwog der Anteil der Isolate mit „Climbing“ (12,5 %) signifikant gegenüber dem einen Stamm mit „Jumping“ (Tab. 4.5).

Mit nur 56,8 % aller untersuchten Stämme lag der Anteil der Isolate mit einem gleichen Empfindlichkeitsverhalten nach 24 und 48 Stunden für Voriconazol deutlich niedriger als bei Fluconazol (86,5 %) oder Flucytosin mit 87,6 %.

Tab. 4.5: Zeitabhängige Empfindlichkeitsänderung im BPT der *Candida tropicalis*-Isolate

Gesamtanzahl der untersuchten Stämme: n = 273 = 100 %

Antimykotikum	Inkubationszeitabhängiges Verhaltensmuster					
	Standing		Climbing		Jumping	
	n	%	n	%	n	%
FCY	239	87,6	33	12,1	1	0,4
FLC	236	86,5	19	7,0	18	6,6
VOR	155	56,8	61	22,3	57	20,9

FCY = Flucytosin **FLC** = Fluconazol **VOR** = Voriconazol

4.1.5 Vergleichende Auswertungen der Empfindlichkeiten

Nicht immer stimmen die Empfindlichkeitsergebnisse der verschiedenen Antimykotika für das einzelne Isolat überein. Diese Unterschiede lassen sich therapeutisch sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie nutzen.

Um die Frage nach dem differenzierten Empfindlichkeitsverhalten gegenüber den getesteten Antimykotika im Vergleich beantworten zu können, wurde deshalb eine Analyse der Empfindlichkeiten innerhalb der stammbezogenen Testungen der einzelnen Isolate auf der Basis des Empfindlichkeitsmusters durchgeführt.

4.1.5.1 Empfindlichkeitsmuster–Analyse der Kontrollstämme

Bei diesem 1988 als „Resistenz–Pattern–Analyse“ beschriebenen Verfahren (FEGELER 1988) und heute aufgrund des erweiterten Einsatzes besser als Empfindlichkeitsmuster(EM)–Analyse (EMA) zu bezeichnenden Verfahren erfolgt die Auswertung der Fragestellung innerhalb des gleichen Untersuchungsansatzes. Da hier die test– und patientenbezogenen Faktoren für alle Antimykotika gleich sind, ist das aus den qualitativen Empfindlichkeitsergebnissen der untersuchten Antimykotika entsprechend der Fragestellung zusammengefasste Muster des einzelnen Isolates „frei“ von patienten– und testbezogenen Faktoren, die sonst vergleichende Auswertungen erheblich beeinflussen können.

Tab. 4.6: Empfindlichkeitsmuster (EM), EM-Basis und EM-Charakter am Beispiel der ATCC- bzw. DSMZ-Typ-Stämme gegenüber Flucytosin (FCY) und Fluconazol (FLC)
 Medium: RPMI Inkubation: 48 h/ 37°C

Stamm ATCC (A) DSMZ (D)	Gattung / Art	Empfindlichkeit (A-B-C- Klassifizierung)		EM-Basis: FCY+FLC						
		FCY	FLC	EM-Charakter						
6258 (A)	<i>C. krusei</i>	A	C	AC						
90878 (A)	<i>C. krusei</i>	B	C		BC					
90874 (A)	<i>C. tropicalis</i>	C	A			CA				
28707 (A)	<i>C. tropicalis</i>	A	A				AA			
11954 (D)	<i>C. kefyr</i>	A	A				AA			
11950 (D)	<i>C. glabrata</i>	A	A				AA			
90030 (A)	<i>C. glabrata</i>	A	C	AC						
44374 (A)	<i>C. albicans</i>	A	A				AA			
76615 (A)	<i>C. albicans</i>	C	A					CA		
44373 (A)	<i>C. albicans</i>	B	A							BA
90028 (A)	<i>C. albicans</i>	B	A							BA
22019 (A)	<i>C. parapsilosis</i>	A	A				AA			
11955 (D)	<i>C. parapsilosis</i>	A	A				AA			
90877 (A)	<i>C. guilliermondii</i>	A	A				AA			

A-B-C-Klassifizierung siehe Tab. 3.6

Ein Empfindlichkeitsmuster (EM) wird einerseits durch die EM-Basis, das ist die durch die Fragestellung festgelegte Reihenfolge der Antimykotika, und andererseits durch die gemäß der EM-Basis zu einem Muster geordneten qualitativen Empfindlichkeitsergebnisse des Isolates (EM-Charakter) bestimmt. Während die EM-Basis für eine Auswertung bei allen Isolaten gleich bleibt, variiert der EM-Charakter in Abhängigkeit von den einzelnen Isolaten (Tab. 4.6).

In der Empfindlichkeitsmuster-Analyse (EMA) werden dann die numerischen Häufigkeiten der gefundenen EM-Charaktere analysiert.

Im vorliegenden Beispiel anhand der qualitativen Breakpointergebnisse der ATCC- bzw. DSMZ-Typstämme fanden sich 6 unterschiedliche EMs, deren numerische Häufigkeit zwischen 1-mal (EM-CA, EM-BA und EM-BC) und 7-mal (EM-AA) variierte.

4.1.5.2 Häufigkeit von Übereinstimmungen, Parallel- und Kreuzresistenzen bei den 273 *C. tropicalis*-Isolaten

In entsprechender Weise wurden die Breakpoint-Ergebnisse der 273 *C. tropicalis*-Isolate analysiert (Tab. 4.7).

Im Nachfolgenden wird von einer Parallelempfindlichkeit, -abweichung bzw. -resistenz gesprochen, wenn die zu vergleichenden Antimykotika derselben Antimykotikaklasse (z.B. den Azolen) angehören. Erfolgt im Gegensatz dazu der Vergleich der Empfindlichkeiten zwischen Antimykotika verschiedener Antimykotikaklassen, so wird von einer Kreuzempfindlichkeit, -abweichung bzw. einer Kreuzresistenz gesprochen.

Für die EM-Basis FLC + VOR fand sich eine Parallelempfindlichkeit (EM: AA, BB, CC) von 95,3 % bei einer Auswertung der untersuchten Stämme nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden belief sich jedoch der Prozentsatz nur noch auf 65,2 %. Signifikant stieg einerseits der Anteil des EM-AB von 2,6 % auf 20,1 % sowie andererseits der des EM-AC von 0,4 % auf 11,4 % an (Tab. 4.7).

Ebenso kam es bei verlängerter Inkubationszeit mit einer Ablesung nach 48 Stunden zu einem Anstieg des Stammanteils mit einer kompletten Parallelresistenz (EM-CC) von 4,4 % auf 12,8 %.

Tab. 4.7: Parallel- und Kreuzempfindlichkeiten der 273 *C. tropicalis*-Isolate auf der Basis ihrer A-B-C-Klassifizierung

Antimykotika	FLC + VOR ¹				FCY + FLC				FCY + VOR ¹			
	24 h		48 h		24 h		48 h		24 h		48 h	
EM	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
AA	247	90,5	135	49,5	150	54,9	126	46,2	150	54,9	71	26,0
AB	7	2,6	55	20,1	3	1,1	7	2,6	2	0,7	38	13,9
AC	1	0,4	31	11,4	1	0,4	18	6,6	2	0,7	42	15,4
BA	1	0,4	0	0	32	11,7	8	2,9	31	11,4	4	1,5
BB	1	0,4	8	2,9	0	0	1	0,4	1	0,4	4	1,5
BC	2	0,7	9	3,3	6	2,2	0	0	6	2,2	1	0,4
CA	2	0,7	0	0	73	26,7	87	31,9	69	25,3	60	22,0
CB	0	0	0	0	1	0,4	9	3,3	5	1,8	21	7,7
CC	12	4,4	35	12,8	7	2,6	17	6,2	7	2,6	32	11,7

EM = Empfindlichkeitsmuster z.B. Empfindlichkeitsklasse FLC = A VOR = C EM = AC

FLC = Fluconazol VOR = Voriconazol FCY = Flucytosin

¹ Auf Grund der abweichenden CLSI-Breakpoints für Voriconazol nur bedingt aussagefähig, s. Text

Ähnlich wie in der S-I-R-Klassifizierung liegt auch bei der A-B-C-Klassifizierung der Schwankungsgrad der Methode bei plus / minus einer Klasse, so dass den Empfindlichkeitsmustern AC bzw. CA beim Vergleich von zwei Antimykotika eine besondere Bedeutung zukommt. Diese auch als einseitige Parallelresistenzen bzw. Kreuzresistenzen bezeichneten Empfindlichkeitsmuster sind therapeutisch von besonderem Interesse.

Dies zeigte auch die Auswertung der Breakpoint-Ergebnisse nach 48 Stunden im Rahmen der EMA der EM-Basis FCY + FLC (Tab. 4.7).

Belief sich bei der Auswertung der Breakpoint-Ergebnisse nach 48 Stunden der Anteil der Empfindlichkeitsklasse **C** (EC-C) für die *C. tropicalis*-Isolate gegenüber Flucytosin auf 41,4 % und gegenüber Fluconazol auf 12,8 %, so ergab sich im Rahmen der EMA nur eine beidseitige Kreuzresistenz von 6,2 %. Von den 113 Isolaten, die gegenüber Flucytosin zur EC-C gehörten, waren 87 (77,0 %) gegenüber Fluconazol der EC-A zuzuordnen.

Für die Isolate der EC–C gegenüber Fluconazol (n = 35) ergab sich im Rahmen der EMA, dass 18 Isolate ein EM–**AC** (FCY/FLC) besaßen, dies entspricht 6,6 % aller Isolate und 51,4 % der EC–C–Isolate.

Die Analyse der Kombination FCY + VOR zeigte, dass Voriconazol ebenfalls gegenüber den 113 Flucytosin–Breakpoint–resistenten Isolaten bei 60 (53,1 %) Isolaten im BPT sensibel war. Legt man die CLSI–Breakpoints zugrunde, so sind es 71,7 % der Flucytosin–Breakpoint–resistenten Isolate.

Eine Analyse über das EM–**AC** (FCY/VOR) verbietet sich jedoch, da eine Auflösung der EC–**C** gegenüber Voriconazol gemäß der CLSI–Breakpoints aufgrund der im Breakpointtest untersuchten Konzentrationen nicht möglich ist.

4.2 Ergebnisse der Kreuztitration (Checkerboard–Testung)

Anhand der Ergebnisse der Breakpoint–Testung zeigte die Empfindlichkeitsmuster–Analyse von FCY und FLC, dass der Anteil einer beidseitigen Kreuzresistenz signifikant geringer war als die jeweiligen resistenten Anteile der beiden Antimykotika allein (Tab. 3.1; Tab. 3.7). Dieses durch die EMA (FCY + FLC) erhobene Ergebnis gab Anlass zu einer Kontrolle in einer in–vitro–Untersuchung mittels Kreuztitration.

4.2.1 Resistenzmuster auf der Basis der A–B–C–Klassifizierung

Die Ergebnisse der Breakpointtestung von den 273 *Candida tropicalis*–Isolaten der Routinediagnostik bildeten die Grundlage, jene Stämme zu ermitteln, welche in den Breakpoint–Tests gegenüber Flucytosin und / oder Fluconazol in die Empfindlichkeitsklasse (EC)–C einzuordnen waren. Hierfür wurde der EC–C die Zahl 6 zugeordnet und der EC–A sowie der EC–B die Zahl 0 und die entsprechenden Resistenzmuster (RM) und ihre Häufigkeiten ermittelt. Insgesamt erwiesen sich 131 Isolate als resistent gegenüber einem oder beiden Antimykotika (Tab. 4.8), die sich auf acht Resistenzmuster verteilten. Die

prozentuale Häufigkeit der einzelnen RM variierte dabei zwischen 0,8 % und 55,0 %.

Aus den 131 resistenten Hefestämmen wurden 29 Isolate mit besonderen Resistenzmustern ausgewählt, wobei Stämme von gleichen Patienten ausgeschlossen wurden, um mittels Kreuztitration die Ergebnisse der EMA von FCY und FLC kritisch zu hinterfragen.

Tabelle 4.8: Resistenzmuster von Flucytosin (FCY) und Fluconazol (FLC) bei 131 *Candida tropicalis*-Stämmen mit teilweiser oder kompletter Resistenz im Breakpointtest

Empfindlichkeitsklasse (EC)*				RM	n	%
FCY		FLC				
24 h	48 h	24 h	48 h			
0	0	0	6	00/06	17	13,0
0	0	6	6	00/66	1	0,8
0	6	0	0	06/00	24	18,3
0	6	0	6	06/06	2	1,5
0	6	6	6	06/66	6	4,6
6	6	0	0	66/00	72	55,0
6	6	0	6	66/06	2	1,5
6	6	6	6	66/66	7	5,3
Total					131	100

EC-C = 6 EC-A oder EC-B = 0 RM = Resistenzmuster

Aufgrund ihres Resistenzmusters wurden die 29 Isolate in sechs Gruppen eingeteilt (Tabelle 4.9). Der Aufbau der Resistenzmuster geht aus der Tabelle 4.8 sowie aus der Legende der Tabelle 4.9 hervor.

Tabelle 4.9 Resistenzmuster (RM) gegenüber Flucytosin und Fluconazol der 29 *C. tropicalis*-Isolate, die für die Kreuztitration ausgewählt wurden

RMG Nr.	RM	Stämme
1	66/00	My 862 II/ 99, My 892/ 99, My 1106/ 99, My 1108/ 99, My 3633 II/99
2	06/00	My 548 II/ 99 ,My 1154/ 99, My 4325/ 99, My 5429 II/ 99,My 7478/ 99
3	00/66	My 14321/ 98, My 14322/98
4	00/06	My 7267 II/ 99, My 5122/ 98, My 6509 II/ 98, My 6994/ 98, My 12617/ 98
5	66/66	My 10827 III/98, My 10851/ 98, My 11000/ 98, My 12490 I/ 98, My 14341/ 98
6	66/06	My 10853/ 98, My 10874/ 98, My 11403/ 98, My 12542 I/ 98, Mx 367/ 99, My 14320/ 98 My 12489 I/ 98
<p>RM = FCY-EC 24h+48h /FLC-EC 24h+48h FCY = Flucytosin FLC = Fluconazol 6 = EC-C 0 = EC-A oder EC-B RMG = Resistenzmustergruppe</p>		

4.2.2 Analyse der Empfindlichkeiten bei den 29 Isolaten des Kontrollkollektives

Bedingt durch den Aufbau der Kreuztitrationsplatte lagen auch MHK-Ergebnisse der Isolate gegenüber den Antimykotika allein vor. Die MHK-Ergebnisse in RPMI 2 % Glucose und deren Verteilung sind für Flucytosin in Tabelle 4.10 und für Fluconazol in Tabelle 4.11 zusammengefasst.

Eine qualitative Einordnung in Sensibilitätsklassen (SC) erfolgte für die Isolate anhand ihrer MHK-Werte auf der Grundlage der CLSI-(NCCLS)-Breakpoints nach der S-I-R-Klassifikation (Tab. 3.5).

Da anhand der ausgesuchten Stämme der Frage nachgegangen werden sollte, ob bei Vorliegen einer Resistenz gegenüber einem oder beiden Antimykotika durch die Kombination der beiden Antimykotika dennoch ein Hemmeffekt und / oder eine Empfindlichkeitsveränderung erreicht werden kann, liegt auswahlbedingt der Anteil an SC-R-Isolaten hier deutlich höher als im Gesamtkollektiv der 273 *C. tropicalis*-Isolate (Tab. 4.10, Tab. 4.11).

Tab. 4.10: Verteilung der kumulativen MHK–Werte für Flucytosin in der Einzeltestung
Medium: RPMI 2 % Glucose

Zeit	Flucytosin–MHK (mg/l)											Total
	SC	S							I		R	
	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>/= 32		
24 h	n	5	2						4	1	17	29
	%	17,2	6,9	0	0	0	0	0	13,8	3,4	58,6	99,9
	% kum	17,2	24,1	24,1	24,1	24,1	24,1	24,1	37,9	41,3	99,9	
48 h	n	3		1	1	2					22	29
	%	10,3	0	3,4	3,4	6,9	0	0	0	0	75,9	99,9
	% kum	10,3	10,3	13,7	17,1	24	24	24	24	24	99,9	

% kum = kumulativer Prozentsatz SC = Sensibilitätsklasse

Zur weiteren Orientierung wurde ein Vergleich der qualitativen Ergebnisse der Breakpoint–Tests in der A–B–C–EC–Klassifikation mit denen der MHK–Bestimmung in der S–I–R–Klassifikation für die einzelnen Isolate durchgeführt.

Für Flucytosin fand sich eine Übereinstimmung der EC–C– und der SC–R–Isolate sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden von 100 % (Tab.4.8, Tab 4.10).

Bei Fluconazol gab es hingegen nach 24 Stunden zwei Abweichungen (EC–C n = 7; SC–R n = 5) und nach 48 Stunden eine Abweichung (EC–C n = 19; SC–R n = 20).

Tab. 4.11: Verteilung der kumulativen MHK–Werte für Fluconazol in der Einzeltestung
Medium: RPMI 2 % Glucose

Zeit	Fluconazol–MHK (mg/l)									
	SC	S						I	R	Total
		0,5	1	2	4	8	16	>/= 32		
24 h	n	9	3	7	3	2			5	29
	%	31	10,3	24,1	10,3	6,9	0		17,2	99,8
	% kum	31	41,3	65,4	75,7	82,6	82,6		99,8	
48 h	n	2	3	3	1				20	29
	%	6,9	10,3	10,3	3,4	0	0		69	99,9
	% kum	6,9	17,2	27,5	30,9	30,9	30,9		99,9	

% kum = kumulativer Prozentsatz SC = Sensibilitätsklasse

4.2.3 Vergleich der MHK–Werte in den unterschiedlichen Medien

Ein Vergleich der MHK–Verteilung in RPMI 2 % Glucose mit den in YST–Medium gewonnenen Ergebnissen wies für Flucytosin nur im Bereich der SC–S ein geringgradig verändertes Verteilungsmuster auf (Tab. 4.10, Tab. 4.12).

Tab. 4.12: Verteilung der kumulativen MHK–Werte für Flucytosin in der Einzeltestung
Medium: YST–Medium

Zeit	Flucytosin–MHK (mg/l)											
	SC	S							I	R	Total	
		0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>/= 32	
24 h	n	4	3						4	1	17	29
	%	13.8	10.3	0	0	0	0	0	13.8	3.4	58.6	99,9
	% kum	13.8	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	37.9	41.3	99.9	
48 h	n	1	2	1	2	1					22	29
	%	3.4	6.9	3.4	6.9	3.4	0	0	0	0	75.9	99,9
	% kum	3.4	10.3	13.7	20.6	24	24	24	24	24	99.9	

% kum = kumulativer Prozentsatz SC = Sensibilitätsklasse

Für Fluconazol lagen die MHK–Werte der SC–S in RPMI 2 % Glucose überwiegend niedriger als < 2 mg/l. Im YST–Medium fand sich jedoch der

überwiegende Anteil der SC–S–Werte bei einer MHK von > 2 mg/l (Tab. 4.11, Tab. 4.13).

Sowohl die Unterschiede im Bereich SC–S für Flucytosin als auch die von Fluconazol erwiesen sich als nicht signifikant.

Tab. 4.13: Verteilung der kumulativen MHK–Werte für Fluconazol in der Einzeltestung
Medium: YST–Medium

Zeit	SC	Fluconazol–MHK (mg/l)							Total
		S					I	R	
		0,5	1	2	4	8	16	>/= 32	
24 h	n	2	2	14	4	2	2	3	29
	%	6.9	6.9	48.3	13.8	6.9	6.9	10.3	100
	% kum	6.9	13.8	62.1	75.9	82.8	89.7	100	
48 h	n			3	6	1		19	29
	%	0	0	10.3	20.7	3.4	0	65.5	99,9
	% kum	0	0	10.3	31	34.4	34.4	99.9	

% kum = kumulativer Prozentsatz SC = Sensibilitätsklasse

Der Anteil an Isolaten in der SC–R entsprach sich für die jeweiligen Antimykotika zu den entsprechenden Auswertzeitpunkten.

4.2.4 Empfindlichkeitsverteilung MHK–Werte der 29 *C. tropicalis*–Isolate in der Kreuztitration (KT) für die einzelnen Antimykotika

Bei der Verteilung der KT–MHK–Werte für Flucytosin (FCY) in der Kombination mit Fluconazol fiel als erstes auf, dass Isolate mit einer KT–MHK von 32 mg/l FCY nicht nachzuweisen waren. Dieser Anteil an Isolaten betrug ohne Kombinationspartner nach 24 Stunden 58,6 % und nach 48 Stunden Inkubationszeit 75,9 % (Tab. 4.10).

In RPMI 2 % Glucose war die häufigste KT–MHK (Modalwert) gegenüber Flucytosin $\leq 0,0625$ mg/l FCY nach 24 Stunden. Auch nach 48 Stunden war die Konzentration von $\leq 0,0625$ mg/l FCY die häufigste KT–MHK, jedoch betrug im Gegensatz zu einem Prozentanteil von 86,2 % nach 24 Stunden der

Prozentsatz an Isolaten mit dieser KT–MHK nur noch 31,0 %. Die KT–MHK–Ergebnisse der verbleibenden Isolate mit einem Prozentanteil von 69 % verteilten sich in dem Konzentrationsbereich von 0,125 mg/l bis 16 mg/l Flucytosin (Tab. 4.14).

Tab. 4.14 Verteilung der kumulativen MHK–Werte für Flucytosin in der Kreuztitration (KT) mit Fluconazol
Medium: RPMI 2 % Glucose

Zeit	SC	Flucytosin–KT–MHK (mg/l)										Total
		S							I		R	
		0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>/= 32	
24 h	n	25							2	2		29
	%	86.2	0	0	0	0	0	0	6.9	6.9	0	100
	% kum	86.2	86.2	86.2	86.2	86.2	86.2	86.2	93.1	100	100	
48 h	n	9		1		3	3	3	4	6		29
	%	31	0	3.4	0	10.3	10.3	10.3	13.8	20.7	0	99,8
	% kum	31	31	34.4	34.4	44.7	55	65.3	79.1	99.8	99.8	

% kum = kumulativer Prozentsatz SC = Sensibilitätsklasse

In RPMI 2 % Glucose fanden sich vom Trend her für die KT–MHK–Verteilung von Fluconazol (FLC) in Kombination mit Flucytosin (FCY) ähnliche Ergebnisse. So war auch hier kein Isolat mit einer KT–MHK von ≥ 32 mg/l FLC nachzuweisen, und der Modalwert lag bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 0,5 mg/l FLC (13 Isolate nach 24 h; 8 Isolate nach 48 h). Auch hier erfolgte nach 48 Stunden eine „Spreizung“ des KT–MHK–Bereiches (Tab.4.15).

Tab. 4.15: Verteilung der kumulativen MHK–Werte für Fluconazol in der Kreuztitration (KT) mit Flucytosin
Medium: RPMI 2 % Glucose

Zeit	SC	Fluconazol–KT–MHK (mg/l)							Total	
		S					I	R		
		0,5	1	2	4	8	16	>/= 32		
24 h	n	13	4	6	6					29
	%	44.8	13.8	20.7	20.7	0	0	0	0	100
	% kum	44.8	58.6	79.3	100	100	100	100	100	
48 h	n	8	3	2	5	9	2			29
	%	27.6	10.3	6.9	17.2	31	6.9	0	0	99,9
	% kum	27.6	37.9	44.8	62	93	99.9	99.9	99.9	

% kum = kumulativer Prozentsatz SC = Sensibilitätsklasse

Im YST–Medium war die Anzahl der Isolate nach 24 Stunden mit 27 Stämmen mit einer KT–MHK von $\leq 0,0625$ mg/l FCY gegenüber 25 Isolaten in RPMI 2 % Glucose annähernd gleich, wohingegen sie sich nach 48 Stunden Inkubationszeit signifikant (YST n = 21; RPMI n = 9) unterschied (Tab. 4.14; Tab. 4.16).

Tab. 4.16: Verteilung der kumulativen MHK–Werte für Flucytosin in der Kreuztitration (KT) mit Fluconazol
Medium: YST–Medium

Zeit	SC	Flucytosin–KT–MHK (mg/l)										Total	
		S							I		R		
		0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>/= 32		
24 h	n	27		1			1						29
	%	93.1	0	3.4	0	0	3.4	0	0	0	0	0	100
	% kum	93.1	93.1	96.5	96.5	96.5	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	
48 h	n	21			2	1	1	2	1		1		29
	%	72.4	0	0	6.9	3.4	3.4	6.9	3.4	0	3.4		99,8
	% kum	72.4	72.4	72.4	79.3	82.7	86.1	93	96.4	96.4	99.8		

% kum = kumulativer Prozentsatz SC = Sensibilitätsklasse

Die Verteilungsunterschiede der KT–MHK–Ergebnisse gegenüber Fluconazol erwiesen sich im Vergleich der beiden Medien nicht als signifikant (Tab. 4.15, Tab. 4.17).

Tab. 4.17: Verteilung der kumulativen MHK–Werte für Fluconazol in der Kreuztitration (KT) mit Flucytosin
Medium: YST–Medium

Zeit	SC	Fluconazol–KT–MHK (mg/l)							Total
		S					I	R	
		0,5	1	2	4	8	16	>/= 32	
24 h	n	13	1	9	6				29
	%	44,8	3,4	31	20,7	0	0	0	99,9
	% kum	44,8	48,2	79,2	99,9	99,9	99,9	99,9	
48 h	n	8	6	10	4	1			29
	%	27,6	20,7	34,5	13,8	3,4	0	0	100
	% kum	27,6	48,3	82,8	96,6	100	100	100	

% kum = kumulativer Prozentsatz

SC = Sensibilitätsklasse

4.2.5 Vergleich der MHK–Ergebnisse und der KT–MHK–Ergebnisse in Abhängigkeit von Medium und Inkubationszeit

Der Vergleich der MHK–Ergebnisse der alleinigen Testung der Antimykotika sowie der MHK–Ergebnisse in der Kreuztitration mit den jeweiligen Kombinationspartner (KT–MHK) wurden zur leichteren Orientierung anhand der Kennwerte der Empfindlichkeitsverteilungen (Tab. 4.10–Tab. 4.17) verglichen. Zur Anwendung für den Vergleich kamen die Sensibilitätskennwerte: der Modalwert (Mode), die MHK50, die MHK90 sowie der untere (MIN) bzw. obere (MAX) Wert des jeweiligen MHK–Bereiches (Tab.4.18, Tab.4.19).

Tab. 4.18: Vergleich der Sensibilitätskennwerte (Mode, MHK50, MHK90, MHK-Bereich) für Flucytosin bei alleiniger Testung und bei Testung in Kombination mit Fluconazol in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Testmedium

Zeit / Medium		Flucytosin MHK (mg/L)				
RPMI 2% Glu		MODE	MHK50	MHK90	MIN	MAX
24 h	allein	≥ 32	≥ 32	≥ 32	0,0625	≥ 32
	Komb.	0,0625	0,0625	8	0,0625	≥ 32
48 h	allein	≥ 32	≥ 32	≥ 32	0,0625	≥ 32
	Komb.	0,0625	2	16	0,0625	16
YST		MODE	MHK50	MHK90	MIN	MAX
24 h	allein	≥ 32	≥ 32	≥ 32	0,0625	≥ 32
	Komb.	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	2
48 h	allein	≥ 32	≥ 32	≥ 32	0,0625	≥ 32
	Komb.	0,0625	0,0625	2	0,0625	≥ 32

MODE : Modalwert, häufigster vorkommender Wert
 MHK50 : MHK, durch die 50% der Isolate gehemmt werden
 MHK90 : MHK, durch die 90% der Isolate gehemmt werden
 MIN : niedrigste MHK MAX : höchste MHK
 allein : MHK-Werte bei alleiniger Testung mit dem Antimykotikum
 Komb : MHK-Werte bei Testung in Kombination mit Fluconazol

Die MHK-Werte gegenüber Flucytosin verteilten sich über den Gesamtbereich der getesteten Konzentrationen in beiden Medien und zu beiden Auswertungszeitpunkten, wobei jedoch die Testung im YST-Medium nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit 2 mg/l eine Ausnahme machte.

Gegenüber Fluconazol stellte sich eine relevante Verminderung des MAX-Wertes in der Kombinationstestung in RPMI 2 % Glucose nach 24 Stunden und im YST-Medium nach beiden Inkubationzeiten dar (Tab. 4.19).

In der Kombinationstestung waren sowohl gegenüber Flucytosin als auch gegenüber Fluconazol der Modalwert und die MHK50 relevant niedriger (Tab. 4.18, Tab.4.19).

Tab. 4.19: Vergleich der Sensibilitätskennwerte (Mode, MHK50, MHK90, MHK–Bereich) für Fluconazol bei alleiniger Testung und bei Testung in Kombination mit Flucytosin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Testmedium

Zeit / Medium		Fluconazol MHK (mg/L)				
RPMI 2% Glu		MODE	MHK50	MHK90	MIN	MAX
24 h	allein	2	2	≥ 32	0,0625	≥ 32
	Komb.	0,5	1	4	0,0625	4
48 h	allein	≥ 32	≥ 32	≥ 32	0,0625	≥ 32
	Komb.	8 / (0,5)*	4	16	0,0625	16
* Anzahl der Isolate MHK 8 mg/L: n = 9; MHK 0,5 mg/L: n= 8						
YST		MODE	MHK50	MHK90	MIN	MAX
24 h	allein	2	2	≥ 32	0,0625	≥ 32
	Komb.	0,5	2	4	0,0625	4
48 h	allein	≥ 32	≥ 32	≥ 32	0,0625	≥ 32
	Komb.	2	2	4	0,0625	8

MODE : Modalwert, häufigster vorkommender Wert
 MHK50 : MHK, durch die 50% der Isolate gehemmt werden
 MHK90 : MHK, durch die 90% der Isolate gehemmt werden
 MIN : niedrigste MHK MAX : höchste MHK
 allein : MHK–Werte bei alleiniger Testung mit dem Antimykotikum
 Komb : MHK–Werte bei Testung in Kombination mit Flucytosin

Auffallend war, dass in RPMI 2 % Glucose für beide Antimykotika der MHK90–Wert bei alleiniger Testung sich nicht relevant unterschied. Im YST–Medium lagen die MHK90–Werte hingegen in der Kombination bei beiden Antimykotika relevant niedriger als bei alleiniger Testung der Antimykotika (Tab. 4.19).

Der Modalwert gegenüber Fluconazol in Kombination mit Flucytosin lag mit 9 von 29 Isolaten bei einer KT–MHK von 8 mg/l nur geringgradig höher als die Anzahl (n = 8) der Isolate mit einer KT–MHK von 0,5 mg/l. Dies warf die Frage auf, inwieweit die bimodale Empfindlichkeitsverteilung von Flucytosin sich hier widerspiegelte, und führte zu einer Analyse der Fractional Inhibitory Concentration auf der Ebene der einzelnen Isolate.

4.2.6 Fractional Inhibitory Concentration–Index (FIC–Index)

Mit der Fractional Inhibitory Concentration (FIC) sowie dem FIC–Index liegen mathematische Verfahren vor, welche es erlauben, den Einfluss einer gleichzeitigen Einwirkung von zwei oder mehreren antimikrobiellen Substanzen in Kombination auf einen Mikroorganismus gegenüber einer alleinigen Gabe quantitativ und qualitativ zu bewerten.

Die Fractional Inhibitory Concentration eines Antimykotikums ist der Quotient aus dem MHK–Wert der Kombinationstestung mittels Kreuztitration gegenüber dem MHK–Wert der einzelnen Substanzen in alleiniger Testung gegenüber dem Mikroorganismus.

Die Summation der FIC–Werte der in der Kreuztitration verwendeten antimikrobiellen Substanzen ergibt den FIC–Index.

Aus dem quantitativen FIC–Index ergibt sich dann eine qualitative Bewertung durch die Zuordnung zu einem synergistischen, additiven, indifferenten oder antagonistischen Verhaltenmuster für die untersuchte Antibiotika– bzw. Antimykotikakombination.

4.2.6.1 Verteilung des Fractional Inhibitory Concentration und der FIC–Indices bei den Kontrollstämmen

Die MHK–Werte bei alleiniger Testung (MHK) gegenüber Flucytosin (FCY) und Fluconazol (FLC) sowie die MHK–Werte in Kombination mittels Kreuztitrationstestung (KT–MHK), die Fractional Inhibitory Concentrations (FIC) sowie die sich daraus ergebenden quantitativen und qualitativen Ergebnisse der FIC–Indices sind für die unterschiedlichen Auswertungszeitpunkte (24 h, 48 h) sowie Medien (RPMI 2 %–Glucose, YST–Medium) in den Tab. 4.20 und Tab. 4.21 dargestellt.

Tab. 4.20: ATCC-Kontrollstämme in RPMI 2 % Glucose

Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der Kreuztitrations-MHK (KT-MHK) sowie die der Fractional Inhibity Concentration (FIC) und FIC-Index gegenüber **Fluconazol** (FLC) und **Flucytosin** (FCY) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

ATCC-Stamm	Stamm-Nr.	MHK (mg/l)		KT-MHK (mg/l)		Fractional Inhibitory Concentration			
		FCY	FLC	FCY	FLC	FIC FCY	FIC FLC	FIC Index	
								Quant.	Qualit.*
	RPMI 2%G 24 h								
24433	<i>C. albicans</i>	1	2	0,0625	2	0,0625	1	1,063	IND
36801	<i>C. albicans</i>	0,5	2	0,125	1	0,25	0,5	0,75	ADD
44373	<i>C. albicans</i>	4	8	0,0625	0,5	0,016	0,0625	0,079	SYN
90028	<i>C. albicans</i>	1	32	1	0,5	1	0,016	1,016	IND
90030	<i>C. glabrata</i>	0,125	32	0,125	0,5	1	0,016	1,016	IND
22019	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	2	0,0625	0,5	0,25	0,25	0,5	SYN
28707	<i>C. tropicalis</i>	0,0625	0,5	0,0625	0,5	1	1	2	ANT
750	<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,5	0,0625	0,5	0,25	1	1,25	IND
90874	<i>C. tropicalis</i>	32	2	0,0625	2	0,002	1	1,002	IND
6258	<i>C. krusei</i>	8	32	8	0,5	1	0,016	1,016	IND
	RPMI 2%G 48 h								
24433	<i>C. albicans</i>	16	4	1	4	0,0625	1	1,063	IND
36801	<i>C. albicans</i>	4	32	0,0625	16	0,016	0,5	0,516	ADD
44373	<i>C. albicans</i>	4	32	0,0625	2	0,016	0,0625	0,079	SYN
90028	<i>C. albicans</i>	4	32	0,0625	8	0,016	0,25	0,266	SYN
90030	<i>C. glabrata</i>	0,125	32	0,0625	0,125	1	0,016	1,016	IND
22019	<i>C. parapsilosis</i>	1	2	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	SYN
28707	<i>C. tropicalis</i>	0,0625	1	0,0625	0,5	1	0,5	1,5	IND
750	<i>C. tropicalis</i>	0,125	32	0,0625	0,5	0,5	0,016	0,516	ADD
90874	<i>C. tropicalis</i>	32	32	4	4	0,125	0,125	0,25	SYN
6258	<i>C. krusei</i>	8	32	8	0,5	1	0,016	1,016	IND

*Qualitativer FIC-Index: SYN = synergistisch ADD = additiv IND = indifferent ANT = antagonistisch

Tab. 4.21: **ATCC-Kontrollstäme in YST-Medium**

Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der Kreuztitrations-MHK (KT-MHK) sowie die der Fractional Inhibitory Concentration (FIC) und FIC-Index gegenüber **Flucytosin** (FCY) und **Fluconazol** (FLC) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

ATCC-Stamm	Stamm-Nr.	MHK (mg/l)		KT-MHK (mg/l)		Fractional Inhibitory Concentration			
		FCY	FLC	FCY	FLC	FIC FCY	FIC FLC	FIC Index	
								Quant.	Qualit.*
	YST 24 h								
24433	<i>C. albicans</i>	2	4	1	4	0,5	1	1,5	IND
36801	<i>C. albicans</i>	0,5	2	0,25	0,5	0,5	0,25	0,75	ADD
44373	<i>C. albicans</i>	1	8	0,25	0,5	0,25	0,0625	0,313	SYN
90028	<i>C. albicans</i>	2	0,5	0,5	0,5	0,25	1	1,25	IND
90030	<i>C. glabrata</i>	4	0,5	0,25	0,5	0,0625	1	1,063	IND
22019	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	2	0,0625	0,5	0,125	0,25	0,375	SYN
28707	<i>C. tropicalis</i>	0,0625	0,5	0,0625	0,5	1	1	2	ANT
750	<i>C. tropicalis</i>	0,5	4	0,0625	1	0,125	0,25	0,375	SYN
90874	<i>C. tropicalis</i>	32	4	0,0625	4	0,002	1	1,002	IND
6258	<i>C. krusei</i>	32	32	32	0,5	1	0,016	1,016	IND
	YST 48 h								
24433	<i>C. albicans</i>	4	8	4	0,5	1	0,0625	1,063	IND
36801	<i>C. albicans</i>	0,5	4	0,25	0,5	0,5	0,125	0,625	ADD
44373	<i>C. albicans</i>	8	4	0,125	0,5	0,016	0,125	0,141	SYN
90028	<i>C. albicans</i>	8	32	0,125	4	0,016	0,125	0,141	SYN
90030	<i>C. glabrata</i>	0,125	32	0,125	0,5	1	0,016	1,063	IND
22019	<i>C. parapsilosis</i>	8	8	0,125	0,5	0,016	0,0625	0,079	SYN
28707	<i>C. tropicalis</i>	0,125	1	0,125	0,5	1	0,5	1,5	IND
750	<i>C. tropicalis</i>	0,5	32	0,0625	4	0,5	0,125	0,625	ADD
90874	<i>C. tropicalis</i>	32	16	0,125	1	0,004	0,0625	0,067	SYN
6258	<i>C. krusei</i>	32	32	32	0,5	1	0,016	1,016	IND

*Qualitativer FIC-Index: SYN = synergistisch ADD = additiv IND = indifferent ANT = antagonistisch

Ein antagonistischer Effekt konnte nur bei dem *C. tropicalis*-Stamm ATCC 28707 nachgewiesen werden (Tab. 4.20, Tab. 4,21). Durch die Verlängerung der Inkubationszeit von 24 auf 48 Stunden ergab sich ein Wechsel des qualitativen FIC-Index von antagonistisch nach indifferent. Dieser Effekt war in beiden Nährmedien zu beobachten.

Eine gleiche qualitative FIC-Index-Bewertung fand sich nach 24 Stunden in beiden Medien 9-mal (A n = 1, IN n = 5, AD n = 1, S n = 2) und nach 48 Stunden in allen 10 untersuchten Stämmen (A n = 0, IN n = 4, AD n = 2, S n = 4). 6 Isolate hatten sowohl in beiden Medien als auch zu beiden Zeitpunkten den gleichen qualitativen FIC-Index (A n = 0, IN n = 3, AD n = 1, S n = 2).

4.2.6.2 Verteilung des Fractional Inhibitory Concentration und der FIC-Indices der 29 *Candida tropicalis*-Isolate

Die MHK-Werte bei alleiniger Testung (MHK) gegenüber Flucytosin (FCY) und Fluconazol (FLC) sowie die MHK-Werte in Kombination mittels Kreuztitrationstestung (KT-MHK), die Fractional Inhibitory Concentrations (FIC) sowie die sich daraus ergebenden quantitativen und qualitativen Ergebnisse der FIC-Indices sind für die unterschiedlichen Auswertungszeitpunkte (24 h, 48 h) sowie Medien (RPMI 2 %-Glucose, YST-Medium) den Tab. 4.22 – Tab. 4.25 zu entnehmen.

Die qualitativen Ergebnisse der FIC-Indices wurden zur leichteren Übersicht für beide Medien und Zeiten in der Tab. 4.26 zusammengefasst und werden im Nachfolgenden besprochen.

Tab. 4.22: Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der Kreuztitrations-MHK (KT-MHK) sowie die der Fractional Inhibitory Concentration (FIC) und der FIC-Index gegenüber **Fluconazol** (FLC) und **Flucytosin** (FCY) nach **24 Std.** Inkubationszeit

Medium: **RPMI 2% Glucose** Testung: gemäß NCCLS M27 A Protokoll

RMG	Stamm-Nr.	MHK (mg/l)		KT-MHK (mg/l)		Fractional Inhibitory Concentration 24h			
		FCY24h	FLC24h	FCY24h	FLC24h	FIC FCY	FIC FLC	FIC Index	
								Quant.	Qualit.*
1	My 862 II/ 99	32	0,5	16	4	0,5	8	8,5	ANT
1	My 892/ 99	32	0,5	16	4	0,5	8	8,5	ANT
1	My 1106/ 99I	32	2	0,0625	1	0,002	0,5	0,502	ADD
1	My 1108/ 99	32	0,5	0,0625	1	0,002	2	2.002	ANT
1	My 3633 II/ 99	32	0,5	0,0625	0,5	0,002	1	1.002	IND
2	My 548 II/ 99	8	1	8	2	1	2	3	ANT
2	My 1154/ 99	16	0,5	0,0625	0,5	0,004	1	1.004	IND
2	My 4325/ 99	8	0,5	0,0625	0,5	0,008	1	1.008	IND
2	My 5429 II/ 99	8	2	8	4	1	2	3	ANT
2	My 7478/ 99I	8	1	0,0625	1	0,008	1	1.008	IND
3	My 14321/ 98	0,0625	32	0,0625	0,5	1	0,016	1.016	IND
3	My 14322 I/ 98	0,0625	32	0,0625	0,5	1	0,016	1.016	IND
4	My 7267 II/ 99	0,0625	0,5	0,0625	0,5	1	1	2	IND
4	My 5122/ 98	0,0625	2	0,0625	0,5	1	0,25	1,25	IND
4	My 6509 II/ 98	0,0625	8	0,0625	0,5	1	0,063	1.063	IND
4	My 6994/ 98	0,125	4	0,0625	0,5	0,5	0,125	0,625	ADD
4	My 12617/ 98	0,125	0,5	0,0625	0,5	0,5	1	1,5	IND
5	My 10827 III/ 98	32	2	0,0625	2	0,002	1	1.002	IND
5	My 10851/ 98	32	32	0,0625	2	0,002	0,063	0,065	SYN
5	My 11000/ 98	32	32	0,0625	4	0,002	0,125	0,127	SYN
5	My 12490 I/ 98	32	32	0,0625	4	0,002	0,125	0,127	SYN
5	My 14341/ 98	32	2	0,0625	2	0,002	1	1.002	IND
6	My 10853/ 98	32	0,5	0,0625	0,5	0,002	1	1.002	IND
6	My 10874/ 98	32	2	0,0625	0,5	0,002	0,25	0,252	SYN
6	My 11403/ 98	32	1	0,0625	0,5	0,002	0,5	0,502	ADD
6	My 12542 I/ 98	32	4	0,0625	2	0,002	0,5	0,502	ADD
6	Mx 367/ 99I	32	8	0,0625	1	0,002	0,125	0,127	SYN
6	My 14320/ 98	32	4	0,0625	4	0,002	1	1.002	IND
6	My 12489 I / 98	32	2	0,0625	2	0,002	1	1.002	IND

* SYN = synergistisch ADD = additiv IND = indifferent ANT = antagonistisch

Tab.4.23: Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der Kreuztitrations-MHK (KT-MHK) sowie die der Fractional Inhibitory Concentration (FIC) und der FIC-Index gegenüber **Fluconazol** (FLC) und **Flucytosin** (FCY) nach **48 Std.** Inkubationszeit

Medium : **RPMI 2% Glucose** Testung: gemäß NCCLS M27 A Protokoll

RMG	Stamm-Nr.	MHK (mg/l)		KT-MHK (mg/l)		Fractional Inhibitory Concentration 48h			
		FCY48h	FLC48h	FCY48h	FLC48h	FIC FCY	FIC FLC	FIC Index	
								Quant.	Qualit.*
1	My 862 II/ 99	32	1	16	16	0,5	16	16,5	ANT
1	My 892/ 99	32	32	16	8	0,5	0,25	0,75	ADD
1	My 1106/ 99I	32	4	4	8	0,125	2	2.125	ANT
1	My 1108/ 99	32	1	2	8	0,063	8	8.063	ANT
1	My 3633 II/ 99	32	1	0,0625	1	0,002	1	1.002	IND
2	My 548 II/ 99	32	2	8	8	0,25	4	4,25	ANT
2	My 1154/ 99	32	0,5	8	4	0,25	8	8,25	ANT
2	My 4325/ 99	32	0,5	1	1	0,031	2	2.031	ANT
2	My 5429 II/ 99	32	32	8	16	0,25	0,5	0,75	ADD
2	My 7478/ 99I	32	2	0,0625	2	0,002	1	1.002	IND
3	My 14321/ 98	0,0625	32	0,0625	0,5	1	0,016	1.016	IND
3	My 14322 I/ 98	1	32	0,0625	0,5	0,063	0,016	0,079	SYN
4	My 7267 II/ 99	0,0625	2	0,0625	0,5	1	0,25	1,25	IND
4	My 5122/ 98	0,0625	32	0,0625	0,5	1	0,016	1.016	IND
4	My 6509 II/ 98	0,25	32	0,25	0,5	1	0,016	1.016	IND
4	My 6994/ 98	0,5	32	0,0625	0,5	0,125	0,016	0,141	SYN
4	My 12617/ 98	1	32	0,0625	0,5	0,063	0,016	0,079	SYN
5	My 10827 III/ 98	32	32	1	4	0,031	0,125	0,156	SYN
5	My 10851/ 98	32	32	4	2	0,125	0,063	0,188	SYN
5	My 11000/ 98	32	32	16	4	0,5	0,125	0,625	ADD
5	My 12490 I/ 98	32	32	16	8	0,5	0,25	0,75	ADD
5	My 14341/ 98	32	32	8	8	0,25	0,25	0,5	SYN
6	My 10853/ 98	32	32	4	1	0,125	0,031	0,156	SYN
6	My 10874/ 98	32	32	0,0625	0,5	0,002	0,016	0,018	SYN
6	My 11403/ 98	32	32	2	4	0,063	0,125	0,188	SYN
6	My 12542 I/ 98	32	32	2	8	0,063	0,25	0,313	SYN
6	Mx 367/ 99I	32	32	1	4	0,031	0,125	0,156	SYN
6	My 14320/ 98	32	32	16	8	0,5	0,25	0,75	ADD
6	My 12489 I / 98	32	32	16	8	0,5	0,25	0,75	ADD

* SYN = synergistisch ADD = additiv IND = indifferent ANT = antagonistisch

Tab. 4.24: Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der Kreuztitrations-MHK (KT-MHK) sowie die der Fractional Inhibitory Concentration (FIC) und FIC-Index gegenüber **Fluconazol** (FLC) und **Flucytosin** (FCY) nach **24 Std.** Inkubationszeit
 Medium : **YST** Testung: gemäß NCCLS M27 A Protokoll

RMG	Stamm-Nr.	MHK (mg/l)		KT-MHK (mg/l)		Fractional Inhibitory Concentration 24h			
		FCY24h	FLC24h	FCY24h	FLC24h	FIC FCY	FIC FLC	FIC Index	
								Quant.	Qualit.*
1	My 862 II/ 99	32	0,5	0,0625	2	0,002	4	4.002	ANT
1	My 892/ 99	32	2	0,0625	2	0,002	1	1.002	IND
1	My 1106/ 99I	32	2	0,0625	2	0,002	1	1.002	IND
1	My 1108/ 99	32	2	0,0625	4	0,002	2	2.002	ANT
1	My 3633 II/ 99	32	2	0,0625	0,5	0,002	0,25	0,252	SYN
2	My 548 II/ 99	8	2	0,0625	2	0,008	1	1.008	IND
2	My 1154/ 99	16	2	0,0625	0,5	0,004	0,25	0,254	SYN
2	My 4325/ 99	8	2	0,0625	0,5	0,008	0,25	0,258	SYN
2	My 5429 II/ 99	8	2	2	0,5	0,25	0,25	0,5	SYN
2	My 7478/ 99I	8	0,5	0,0625	0,5	0,008	1	1.008	IND
3	My 14321/ 98	0,0625	16	0,0625	0,5	1	0,031	1.031	IND
3	My 14322 I/ 98	0,125	8	0,0625	0,5	0,5	0,063	0,563	ADD
4	My 7267 II/ 99	0,0625	1	0,0625	0,5	1	0,5	1,5	IND
4	My 5122/ 98	0,0625	2	0,0625	0,5	1	0,25	1,25	IND
4	My 6509 II/ 98	0,0625	8	0,0625	0,5	1	0,063	1.063	IND
4	My 6994/ 98	0,125	2	0,0625	0,5	0,5	0,25	0,75	ADD
4	My 12617/ 98	0,125	2	0,0625	0,5	0,5	0,25	0,75	ADD
5	My 10827 III/ 98	32	2	0,0625	2	0,002	1	1.002	IND
5	My 10851/ 98	32	32	0,0625	2	0,002	0,063	0,065	SYN
5	My 11000/ 98	32	32	0,0625	4	0,002	0,125	0,127	SYN
5	My 12490 I/ 98	32	32	0,0625	4	0,002	0,125	0,127	SYN
5	My 14341/ 98	32	4	0,0625	2	0,002	0,5	0,502	ADD
6	My 10853/ 98	32	2	0,0625	2	0,002	1	1.002	IND
6	My 10874/ 98	32	4	0,0625	0,5	0,002	0,125	0,127	SYN
6	My 11403/ 98	32	1	0,0625	1	0,002	1	1.002	IND
6	My 12542 I/ 98	32	4	0,0625	4	0,002	1	1.002	IND
6	Mx 367/ 99I	32	16	0,25	2	0,008	0,125	0,133	SYN
6	My 14320/ 98	32	4	0,0625	4	0,002	1	1.002	IND
6	My 12489 I / 98	32	2	0,0625	4	0,002	2	2.002	ANT

* SYN = synergistisch ADD = additiv IND = indifferent ANT = antagonistisch

Tab. 4.25: Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der Kreuztitrations –MHK (KT–MHK) sowie die der Fractional Inhibitory Concentration (FIC) und FIC–Index gegenüber **Fluconazol** (FLC) und **Flucytosin** (FCY) nach **48 Std.** Inkubationszeit

Medium : **YST** Testung : gemäß NCCLS M27 A Protokoll

RMG	Stamm-Nr.	MHK (mg/l)		KT–MHK (mg/l)		Fractional Inhibitory Concentration 48h			
		FCY48h	FLC48h	FCY48h	FLC48h	FIC FCY	FIC FLC	FIC Index	
								Quant.	Qualit.*
1	My 862 II/ 99	32	4	0,0625	4	0,002	1	1,002	IND
1	My 892/ 99	32	4	0,0625	2	0,002	0,5	0,502	ADD
1	My 1106/ 99I	32	4	0,0625	4	0,002	1	1,002	IND
1	My 1108/ 99	32	2	0,0625	4	0,002	2	2,002	ANT
1	My 3633 II/ 99	32	2	0,0625	4	0,002	2	2,002	ANT
2	My 548 II/ 99	32	4	0,0625	2	0,002	0,5	0,502	ADD
2	My 1154/ 99	32	4	4	4	0,125	1	1,125	IND
2	My 4325/ 99	32	4	0,0625	2	0,002	0,5	0,502	ADD
2	My 5429 II/ 99	32	32	32	16	1	0,5	1,5	IND
2	My 7478/ 99I	32	2	0,0625	2	0,002	1	1,002	IND
3	My 14321/ 98	0,125	32	0,0625	0,5	0,5	0,016	0,516	ADD
3	My 14322 I/ 98	0,5	32	0,0625	0,5	0,125	0,016	0,141	SYN
4	My 7267 II/ 99	0,0625	32	0,0625	0,5	1	0,016	1,016	IND
4	My 5122/ 98	0,125	32	0,0625	0,5	0,5	0,016	0,516	ADD
4	My 6509 II/ 98	0,25	32	0,0625	0,5	0,25	0,016	0,266	SYN
4	My 6994/ 98	1	32	0,0625	0,5	0,063	0,016	0,079	SYN
4	My 12617/ 98	0,5	32	0,0625	0,5	0,125	0,016	0,141	SYN
5	My 10827 III/ 98	32	32	1	4	0,031	0,125	0,156	SYN
5	My 10851/ 98	32	32	2	4	0,063	0,125	0,188	SYN
5	My 11000/ 98	32	32	8	8	0,25	0,25	0,5	SYN
5	My 12490 I/ 98	32	32	4	8	0,125	0,25	0,375	SYN
5	My 14341/ 98	32	8	0,0625	4	0,002	0,5	0,502	ADD
6	My 10853/ 98	32	32	0,0625	4	0,002	0,125	0,127	SYN
6	My 10874/ 98	32	32	0,0625	0,5	0,002	0,016	0,018	SYN
6	My 11403/ 98	32	32	0,0625	2	0,002	0,063	0,065	SYN
6	My 12542 I/ 98	32	32	0,0625	8	0,002	0,25	0,252	SYN
6	Mx 367/ 99I	32	32	0,5	2	0,016	0,063	0,079	SYN
6	My 14320/ 98	32	32	0,0625	4	0,002	0,125	0,127	SYN
6	My 12489 I / 98	32	32	0,5	8	0,016	0,25	0,266	SYN

* SYN = synergistisch ADD = additive IND = indifferent ANT = antagonistisch

Ein antagonistischer Effekt bei der Kombination der beiden Antimykotika stellte sich nur in den Resistenzmustergruppen (RMG) RGM 1, RGM 2 sowie in einem

Fall in RMG 6 dar. Die Häufigkeit variierte sowohl in Bezug auf die Nährmedien als auch auf die unterschiedlichen Auswertungszeitpunkte (Tab. 4.24).

Tab 4.26: Qualitative Fractional Inhibitory Concentration(FIC)–Indices der Kreuztitrationen von **Fluconazol** (FLC) und **Flucytosin** (FCY) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und den Medien (RPMI 2 % Glucose, YST)

RMG	Stamm-Nr.	RPMI		YST		FIC 24 h		FIC 48 h	
		FIC24h	FIC48h	FIC24h	FIC48h	RPMI	YST	RPMI	YST
1	My 862 II/ 99	A	A	A	I	A	A	A	I
1	My 892/ 99	A	AD	I	AD	A	I	AD	AD
1	My 1106/ 99	AD	A	I	I	AD	I	A	I
1	My 1108/ 99	A	A	A	A	A	A	A	A
1	My 3633 II/ 99	I	I	S	A	I	S	I	A
2	My 548 II/ 99	A	A	I	AD	A	I	A	AD
2	My 1154/ 99	I	A	S	I	I	S	A	I
2	My 4325/ 99	I	A	S	AD	I	S	A	AD
2	My 5429 II/ 99	A	AD	S	I	A	S	AD	I
2	My 7478/ 99	I	I	I	I	I	I	I	I
3	My 14321/ 98	I	I	I	AD	I	I	I	AD
3	My 14322 I/ 98	I	S	AD	S	I	AD	S	S
4	My 7267 II/ 99	I	I	I	I	I	I	I	I
4	My 5122/ 98	I	I	I	AD	I	I	I	AD
4	My 6509 II/ 98	I	I	I	S	I	I	I	S
4	My 6994/ 98	AD	S	AD	S	AD	AD	S	S
4	My 12617/ 98	I	S	AD	S	I	AD	S	S
5	My 10827 III/ 98	I	S	I	S	I	I	S	S
5	My 10851/ 98	S	S	S	S	S	S	S	S
5	My 11000/ 98	S	AD	S	S	S	S	AD	S
5	My 12490 I/ 98	S	AD	S	S	S	S	AD	S
5	My 14341/ 98	I	S	AD	AD	I	AD	S	AD
6	My 10853/ 98	I	S	I	S	I	I	S	S
6	My 10874/ 98	S	S	S	S	S	S	S	S
6	My 11403/ 98	AD	S	I	S	AD	I	S	S
6	My 12542 I/ 98	AD	S	I	S	AD	I	S	S
6	Mx 367/ 99	S	S	S	S	S	S	S	S
6	My 14320/ 98	I	AD	I	S	I	I	AD	S
6	My 12489 I/ 98	I	AD	A	S	I	A	AD	S

* S = synergistisch AD = additiv I = indifferent A = antagonistisch
 RMG = Resistenzmustergruppe, die verschiedenen Muster finden sich in Tab. 3.9

Im **Medium RPMI 2 % Glucose** zeigte sich bei insgesamt 7 der 29 Isolate ein antagonistischer Effekt in der Kombinationstestung (Tab. 4.26). Bei drei Stämmen (MY 862 II, MY 1108, MY 548 II) trat das antagonistische Verhalten sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden auf. Ein Wechsel des qualitativen FIC-Index von indifferent nach antagonistisch ergab sich bei den Stämmen (MY 1154, MY 4325) der RGM 2 durch die Verlängerung der Inkubationszeit von 24 auf 48 Stunden. Konträr dazu verhielten sich die Isolate MY 892 und MY 5429 II. Bei diesen Stämmen kam es durch die verlängerte Inkubationszeit zu einem Wechsel von Antagonismus (24 h) zu einem additiven Effekt (48 h).

Im **YST-Medium** lagen die Isolate, bei denen ein antagonistischer Effekt in der Kombinationstestung zu verzeichnen war, in der RMG 1 (MY 862 II, MY 1108, MY 3633 II) und in der RMG 6 (MY 12489I). Der antagonistische Effekt bei der Kombinationstestung war schon nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden nachweisbar (Tab. 4.26).

Das Isolat (MY 12489 I) der RMG 6 war jedoch nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden von seinem qualitativen FIC-Index als synergistisch einzuordnen. Nach 48 Stunden zeigte sich für die beiden anderen Isolate der RMG 1 in der Kombinationstestung einerseits ein indifferentes Verhalten (MY862 II) und andererseits ein Fortbestehen des antagonistischen Effekts (MY 1108).

Bei einem Isolat (MY 3633) der RMG 1 kam es zu einem Wechsel des Effektes in der Kombinationstestung von synergistisch zu antagonistisch bei der verlängerten Inkubationszeit (48 Stunden).

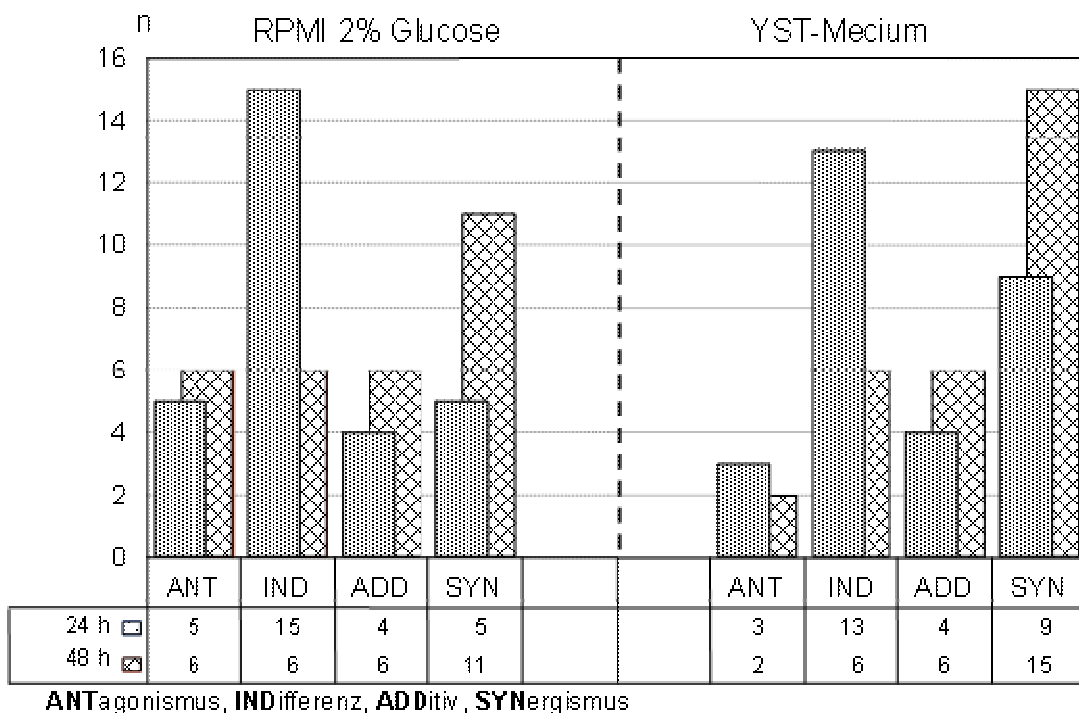
Nur ein Isolat (MY 1108) wies gleichzeitig einen antagonistischen Effekt sowohl in beiden Medien als auch nach beiden Inkubationszeiten auf.

Eine gleiche qualitative FIC-Index-Bewertung fand sich nach 24 Stunden in beiden Medien 16-mal (A n = 2, IN n = 8, AD n = 2, S n = 4) und nach 48 Stunden 14-mal (A n = 1, IN n = 2, AD n = 1, S n = 10). Nur 6 Isolate hatten sowohl in beiden Medien als auch zu beiden Zeitpunkten den gleichen qualitativen FIC-Index (A n = 1, IN n = 2, S n = 3).

4.2.6.3 Verteilung der Isolate auf die vier qualitativen FIC-Index- Gruppen und ihre zeitlichen Veränderungen

Die Verteilung der Isolate auf die vier qualitativen FIC-Index-Gruppen und ihre zeitlichen Veränderungen zeigten ein unterschiedliches Verteilungsmuster sowohl für beide Medien als auch für beide Inkubationszeiten (Abb. 3.3). In beiden Medien kam es nach Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden zu einer erhöhten Anzahl an Isolaten, bei denen ein synergistischer Effekt nachweisbar war. Aufgrund des bewusst zusammengesetzten Kollektivs sowie der kleinen Fallzahl wurde von statistischen Signifikanzberechnungen hier Abstand genommen.

Abb.4.2 : Verteilung der qualitativen FIC-Indices der 29 *C.tropicalis* - Isolate für die Kombination Flucytosin und Fluconazol in Abhängigkeit vom Medium und der Inkubationszeit



4.2.6.4 Bewertung der Isolate mit einem qualitativen antagonistischen FIC-Index aus klinisch-therapeutischer Sicht

Betrachtet man die MHK-Werte von Flucytosin und Fluconazol bei alleiniger Testung (MHK) bei den Stämmen mit einem qualitativen antagonistischen FIC-Index unter Berücksichtigung der S-I-R-Klassifikation (Tab.3.5), so ist festzustellen, dass die MHK-Werte gegenüber Fluconazol bei allen Stämmen im sensiblen Bereich lagen. Für Flucytosin waren hingegen alle Stämme mit Ausnahme von zwei Isolaten, die intermediär (MHK 8 mg/l) waren, mit einer MHK ≥ 32 mg/l als resistent einzustufen (Tab. 4.27).

Die Kreuztitrations-MHK-Werte (KT-MHK) gegenüber Fluconazol erwiesen sich in der Regel als höher als die MHK-Werte bei der Testung gegenüber Fluconazol allein. Bis auf einen Stamm, der intermediär war, lagen jedoch alle Isolate mit einer MHK von ≤ 8 mg/l Fluconazol im sensiblen Bereich.

Bei der Betrachtung der KT-MHK-Werte von Flucytosin und Fluconazol im Zusammenhang ließen sich 2 Gruppen unterscheiden. Bei all jenen Stämmen, bei denen die KT-MHK von FCY $\leq 0,0625$ mg/l war, sollte von einer alleinigen Wirkung des Fluconazols ausgegangen werden. In den anderen Fällen lag dann ein echter additiver oder synergistischer Effekt für die Flucytosin-MHK vor, wenn der FIC-Wert $< 0,5$ war.

Für die Einstufung der Ergebnisse der Kombinationstestung in die qualitative FIC-Index-Gruppe mit antagonistischem Verhalten waren immer die FIC-Werte von Fluconazol entscheidend, d. h. die Veränderung der MHK lag im Bereich von Fluconazol.

Betrachtete man die KT-MHK-Werte von Fluconazol für die Isolate mit einem qualitativ antagonistischen FIC-Index, so erwiesen sich alle Isolate als sensibel gegenüber Fluconazol, bis auf einen Stamm (MY 862 II), der intermediär sensibel war (Tab. 4.27).

Der durch den FIC-Index dargestellte Antagonismus bei der Kombinationstestung ließ sich anhand der KT-MHK für Fluconazol und

Flucytosin aus klinisch–therapeutischer Sicht nicht bestätigen und somit nicht als relevant einstufen.

Tab.4.27: *C. tropicalis*–Isolate mit einem qualitativen antagonistischen FIC–ndex gegenüber der Kombination von **Fluconazol** (FLC) und **Flucytosin** (FCY) und ihre Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentration (MHK), der Kreuztitrations–MHK (KT-MHK) sowie der Fractional Inhibitory Concentration (FIC) und des FIC–Index

RMG Medium Zeit	Stamm-Nr.	MHK (mg/l)		KT-MHK (mg/l)		Fractional Inhibitory Concentration			
		FCY	FLC	FCY	FLC	FIC FCY	FIC FLC	FIC Index	
								Quant.	Qualit.*
1-R24	My 862 II/ 99	32	0,5	16	4	0,5	8	8,5	A
1-R48	My 862 II/ 99	32	1	16	16	0,5	16	16,5	A
1-R24	My 1108/ 99	32	0,5	0,0625	1	0,002	2	2.002	A
1-R48	My 1108/ 99	32	1	2	8	0,063	8	8.063	A
2-R24	My 548 II/ 99	8	1	8	2	1	2	3	A
2-R48	My 548 II/ 99	32	2	8	8	0,25	4	4,25	A
1-Y24	My 1108/ 99	32	2	0,0625	4	0,002	2	2.002	A
1-Y48	My 1108/ 99	32	2	0,0625	4	0,002	2	2,002	A
1-R24	My 892 / 99	32	0,5	16	4	0,5	8	8,5	A>AD
2-R24	My 5429 II/ 99	8	2	8	4	1	2	3	A>AD
1-Y24	My 862 II/ 99	32	0,5	0,0625	2	0,002	4	4.002	A>IN
6-Y24	My12489 I / 98	32	2	0,0625	4	0,002	2	2.002	A>S
1-R48	My 1106/ 99	32	4	4	8	0,125	2	2.125	AD>A
2-R48	My 1154/ 99	32	0,5	8	4	0,25	8	8,25	IN>A
2-R48	My 4325/ 99	32	0,5	1	1	0,031	2	2.031	IN>A
1-Y48	My 3633 II/ 99	32	2	0,0625	4	0,002	2	2,002	S>A

* S = synergistisch AD = additiv IN = indifferent A = antagonistisch
R = RPMI1640-2 % Glucose Y = YST-Medium

5 Diskussion

Die Inzidenz von Mykosen, vor allem durch Hefen der Gattung *Candida*, nimmt weltweit zu und stellt damit die Medizin vor diagnostische und therapeutische Probleme. In den USA sind Candidämien bereits die vierthäufigste Ursache nosokomialer Blutinfektionen (BORG–VON ZEPPELIN 2007).

Am häufigsten werden Mykosen durch den Erreger *C. albicans* beschrieben. In den letzten Jahren wurde jedoch eine Zunahme der non-*C. albicans*-Spezies beobachtet (RANDHAWA 2000). Inzwischen werden 60–70 % aller Candidämien von non-*C. albicans*-Stämme verursacht (CUENCA-ESTRELLA 2002). Seit Beginn der 1980er Jahre konnte *Candida tropicalis* mit einer Zunahme von 400 % als Sepsiserreger nachgewiesen werden (LU 2004) und ist weltweit damit die dritthäufigste *Candida*-Spezies, die im Blut von Sepsispatienten nachgewiesen werden kann (FLECK 2007).

Candida tropicalis wird gehäuft bei immunsupprimierten Patienten, z.B. bei HIV-Infizierten und neutropenischen Patienten, sowie Tumorpatienten isoliert (POLAK 2001, TAKAKURA 2004). Wahrscheinlich ist daher die Virulenz von *Candida tropicalis* größer als jene von *C. albicans* (CHOWDHARY 2003, HEIZMANN 1993) – bis zu 60 % aller *C. tropicalis*-infizierten Sepsispatienten versterben innerhalb eines Monats nach Pilznachweis (BEDINI 2006); damit besitzt *C. tropicalis* die höchste Mortalitätsrate bei einer Candidämie (ALMIRANTE 2005).

Der Breakpoint-Test hat sich in der Routinediagnostik von Hefen als schnelle und sichere Screeninguntersuchung durchgesetzt (FEGELER 1997). Daher wurden in der vorliegenden Studie die Empfindlichkeitsverteilungen von 273 unselektionierten *Candida tropicalis*-Isolaten (100 %) der mykologischen Routinediagnostik gegenüber den Antimykotika Flucytosin (FCY), Fluconazol (FLC) und Voriconazol (VOR) mittels Breakpoint-Testung ermittelt und analysiert. Die Untersuchung erfolgte in Anlehnung an das NCCLS M27 A-Protokoll (jetzt CLSI M27 A2-Protokoll). Die Auswertung wurde bei 37° C nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden visuell durchgeführt.

Gegenüber Flucytosin erwiesen sich nach 48 Stunden 55,3 % der untersuchten *Candida tropicalis*-Stämme als sensibel (MHK \leq 8 mg/l). Es war jedoch ein hoher Anteil an Flucytosin-resistenten Isolaten zu verzeichnen. Nach 24 Stunden konnte bei einer MHK von \geq 25 μ g/ml mit 29,7 % nahezu jeder dritte Stamm als resistent bezeichnet werden; nach 48 Stunden stieg der Anteil der resistenten *Candida tropicalis*-Stämme sogar auf 41,4 %. Gegenüber Flucytosin fand sich somit eine bimodale Empfindlichkeitsverteilung mit einer besonders starken Ausprägung nach 48 Stunden. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Resistenzanteil von 42,7 % überein, den POLAK-WYSS (1989) in ihrer Untersuchung beobachtet hat. Definiert man eine Resistenz bereits bei einem Breakpoint-MHK von \geq 16 μ g/ml, so zeigten POTEL (1982) und WEBER (1991) sogar 64 % – 70 % Flucytosin-resistente Stämme. Andere Autoren v.a. aus den USA, Spanien und Japan berichten aber auch über wesentlich geringere Raten von bis zu 4,5 % Flucytosin-resistenter Stämme bzw. von deutlich niedrigeren MIC₉₀-Werten um 0,25 μ g/ml (BERENQUER 1995, BORG-VON ZEPELIN 2005, OHKAWA 1990, PFALLER 1995). Ursächlich für diesen geringeren Resistenzanteil ist zum einen die Festlegung der Breakpoint-MHK bei z.T. deutlich höheren Konzentrationen wie z.B. bei Studien von FLECK (2007) (FCY-Breakpoint-MHK \geq 64 mg/l) oder TAKAKURA (2004) (FCY-Breakpoint-MHK \geq 32 mg/l). Zum anderen können jedoch auch geographische Faktoren eine Rolle spielen. CUENCA-ESTRELLA (2002) fand bei spanischen Sepsispatienten in 1,8 % der Fälle *Candida tropicalis*-Isolate, die gegen Flucytosin resistent waren (Breakpoint-MHK \geq 8 mg/l), bei argentinischen Patienten dagegen erhöhte sich dieser Anteil auf 10,6 %.

Trotz seines vorwiegend auf Hefen begrenzten Aktivitätsspektrums (GEMEINHARDT 1976) und seines teilweise problematischen Resistenzanteiles bei *C. albicans* und bei *Candida-non-albicans*-Spezies bietet das Pyrimidinderivat Flucytosin bei der Behandlung systemischer Candidosen durch seine Pharmakokinetik und Pharmakodynamik in der Kombinationstherapie mit anderen Antimykotika, insbesondere Amphotericin B, bei sensiblen Stämmen in vivo auch viele Vorteile. Aufgrund seiner Liquorgängigkeit kann es als Kombinationspartner in der Therapie der

Candida-Meningitis eingesetzt werden (STEER 1972). Von einer Monotherapie ist wegen einer eventuellen schnellen Resistenzentwicklung abzusehen. Flucytosin ist gut resorbierbar und wird daher nahezu vollständig über die Nieren ausgeschieden.

In der vorliegenden Studie waren gegen Fluconazol nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden 81 % der *C. tropicalis*-Isolate empfindlich (MHK \leq 8 mg/l). Im Gegensatz zu Flucytosin lag der Anteil an Fluconazol-resistenten Stämmen (MHK \geq 25 μ g/ml) nach 24 Stunden bei 5,1 % und auch nach 48 Stunden insgesamt nur bei 12,8 %. Dieser Wert ist identisch mit den Ergebnissen einer Arbeit von SEIBOLD (1995) mit einem kleineren Gesamtkollektiv von 15 *Candida tropicalis*-Stämmen. SCHMALRECK (1996) beobachtet in einer Untersuchung an *C. tropicalis*-Stämmen einen Resistenzanteil von 19,8 % der Isolate, jedoch lag die Resistenzgrenze in der Untersuchung mit einer MHK von \geq 16 μ g/ml niedriger als in anderen Untersuchungen. Andere Autoren berichten dagegen über einen noch geringeren Anteil resistenter Stämme als in der vorliegenden Untersuchung (BEDINI 2006: 3,2 %). Allerdings wurde in diesen Studien die MHK bei \geq 64 mg/l festgelegt. Die meisten Autoren stimmen in ihren Ausführungen mit den vorliegenden Ergebnissen überein, dass Fluconazol eine gute Empfindlichkeit gegenüber *Candida tropicalis* zeigt. ST-GERMAIN (1999) konnte in vitro bei Patienten mit *Candida tropicalis*-Infektion, die zuvor noch kein Azolantimykotikum erhalten hatten, bei keinem Stamm nach 48 Stunden eine Resistenz gegenüber Fluconazol nachweisen.

Ähnlich wie Flucytosin ist Fluconazol liquorgängig und wird über die Nieren ausgeschieden. Fluconazol ist hämodialysierbar. Bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von $<$ 1000 g beschreibt MOREIRA (2005) eine gute Verträglichkeit und bei einer prophylaktischen Gabe der Substanz einen Rückgang der Pilzinfektionen. Auch KAUFFMAN (2001) befürwortet für ältere Patienten zur Behandlung tiefer Mykosen eher eine Therapie mit Fluconazol, da bei Amphotericin B die intrinsische Nephrotoxizität für ältere Erwachsene problematisch ist. Allerdings wird gerade der unkritische Einsatz von Fluconazol in niedriger Dosierung in der Prophylaxe von tiefen Mykosen für den steigenden Anteil von non-*C. albicans*-Stämmen verantwortlich gemacht. Diese Stämme

besitzen nicht selten höhere MHK–Werte als *C. albicans*–Isolate. So zeigte TAKAKURA (2004) bei einem kleinen Patientenkollektiv von 24 Patienten, die eine Antimykotika–Prophylaxe mit Fluconazol (14 Patienten), Itraconazol (4 Patienten) oder Nystatin (6 Patienten) erhielten, dass der Anteil der Patienten, bei denen der Problemkeim *Candida tropicalis* nachgewiesen werden konnte, sich von 12,9 % unter der Prophylaxe auf 25 % erhöhte. Aufgrund des eingeschränkten Nebenwirkungsspektrums wird Fluconazol zunehmend bei der Behandlung von systemischen Candidosen anstelle der etablierten Therapie mit Amphotericin B (mit oder ohne Flucytosin) als Monotherapie eingesetzt.

Nach Abschluss der vorliegenden Untersuchung wurden durch das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, ehemals NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards) Breakpoints für Voriconazol eingeführt, die teilweise oberhalb der untersuchten Voriconazolkonzentrationen lagen, so dass eine weitergehende Beurteilung von Voriconazol mit den vorliegenden Daten nicht möglich ist. Nach CLSI–Breakpoint–Festlegung waren 71,4 % der untersuchten Stämme nach 48 Stunden gegen Voriconazol sensibel.

Weitere Vergleiche des Empfindlichkeitsverhaltens der Antimykotika mit anderen Studienergebnissen sind jedoch insgesamt nicht sinnvoll, da trotz Anlehnung der meisten Studien an NCCLS–Protokolle sich die meisten Studien im verwendeten Medium, der Inkubationszeit, in der Festlegung der Minimalen Hemmkonzentration oder im Ablesungsverfahren bzw. der Testmethode (visuelle Ablesung, spektrometrische Beurteilung, E–Test etc.) unterscheiden (ESPINEL–INGROFF 2003). Zudem müssen anscheinend auch geographische Unterschiede berücksichtigt werden (CUENCA–ESTRELLA 2002, BORG–VON ZEPPELIN 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Breakpoint–Testung gezeigt werden, dass über den Beobachtungszeitraum von 48 Stunden Fluconazol und Flucytosin ihr Empfindlichkeitsverhalten beibehielten. 86,5 % der *Candida tropicalis*–Stämme waren gegenüber Fluconazol nach 48 Stunden derselben

Empfindlichkeitsklasse wie nach 24 Stunden zuzuordnen. Gegenüber Flucytosin zeigten sogar 87,6 % aller untersuchten Stämme ein gleichbleibendes Empfindlichkeitsverhalten.

Änderte sich das Empfindlichkeitsverhalten innerhalb der Inkubationszeit von 48 Stunden um mehr als eine Konzentrationsstufe, wurde dieses Verhalten als „Jumping“ bezeichnet. Eine solche relevante inkubationszeitabhängige Empfindlichkeitsänderung zeigte sich bei Flucytosin in 0,4 %, bei Fluconazol bei 6,6 % und bei Voriconazol bei 20,9 % der Isolate.

Ein Ausschluss von Stämmen für eine erweiterte Empfindlichkeitsbestimmung sollte daher frühestens nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden erfolgen.

Um die Frage nach einem differenzierten Empfindlichkeitsverhalten gegenüber den getesteten Antimykotika im Vergleich beantworten zu können, wurde deshalb mit der Empfindlichkeitsmuster-Analyse (EMA) eine Untersuchung der Empfindlichkeiten innerhalb der stammbezogenen Testungen der einzelnen Isolate auf der Basis des Empfindlichkeitsmusters im Breakpointtest durchgeführt (FEGELER 1988).

Bei der Kombination Voriconazol und Fluconazol konnte eine Parallelempfindlichkeit von 95,3 % der Stämme nach 24 Stunden nachgewiesen werden, nach 48 Stunden jedoch verringerte sich der Anteil auf nur 65,2 %. Ebenso kam es nach 48 Stunden zu einem Anstieg der Parallelresistenz von 4,4 % auf 12,8 %. Diese Ergebnisse stützen Aussagen von Autoren, die in ihren Untersuchungen eine „Parallelresistenz“ der Azolantimykotika beschrieben haben (PFALLER 2007). HUGHES (1988) berichtet über parallelresistente *C. albicans*-Stämme gegenüber Fluconazol und Ketokonazol. HITCHCOCK (1993) vermutete eine erhöhte Barrierefunktion für radiomarkiertes Fluconazol in die Pilzzelle von *Candida glabrata*-Stämmen, die gegen Itraconazol und Ketokonazol resistent waren. Auch VAN DEN BOSCHE (1992) und METZGER (1997) beschreiben bei *Candida*-Stämmen Parallelesistenzen zwischen den verschiedenen Azolantimykotika.

Eine Empfindlichkeitsmuster-Analyse der Kombination Flucytosin und Voriconazol konnte nicht durchgeführt werden, da eine Auflösung der Empfindlichkeitsklasse gegenüber Voriconazol gemäß der später eingeführten CLSI-Breakpoints nicht möglich war.

Bei der Auswertung der EM-Basis „Flucytosin + Fluconazol“ ergab sich nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden eine Kreuzresistenz von 6,2 %. Dies ist bemerkenswert, da der Anteil der Breakpoint-resistenten Stämme gegenüber Flucytosin bei 41,4 % und gegenüber Fluconazol bei 12,8 % lag. 77 % der gegenüber Flucytosin-resistenten Stämme waren gegenüber Fluconazol als sensibel einzuordnen. 51,4 % der Fluconazol-resistenten Stämme erwiesen sich gegenüber Flucytosin als sensibel.

Damit war der Anteil einer beidseitigen Kreuzresistenz signifikant geringer als die jeweiligen resistenten Anteile der beiden Antimykotika.

Anhand der Ergebnisse der Breakpoint-Testung ließ die Empfindlichkeitsmuster-Analyse vermuten, dass eine Kombination von Fluconazol mit Flucytosin sinnvoll sein könnte. Dieses Ergebnis gab den Anlass zur weiterführenden in-vitro-Untersuchung mittels Kreuztitration.

Da keines der existierenden Antimykotika aus den drei bekannten Substanzgruppen der Polyene (Amphotericin B), der fluoridierten Pyrimidine (Flucytosin) und der Azolpräparate (Fluconazol, Voriconazol) die Idealvoraussetzungen in der Behandlung einer systemischen Candidose erfüllt, wurde die Kombinationstherapie in die Chemotherapie der tiefen Mykosen eingeführt.

Eine Kombinationstherapie sollte im Vergleich zur Monotherapie eine Wirkungsverstärkung und ein synergistisches Verhalten der eingesetzten Antimykotika bewirken, sollte gut bzw. besser als die Monotherapie verträglich sein sowie in der Häufigkeit resistenten Verhaltens überlegen sein (WEGMANN 1994).

PFALLER (2007) nutzte die in-vitro-Azol-Kreuzresistenz von Voriconazol und Fluconazol, um bei Fluconazol-resistenten Stämmen eine prädiktive Aussage für ihr Verhalten gegen Voriconazol machen zu können.

In der Literatur sind zwar Studien beschrieben, in denen sowohl Fluconazol als auch Flucytosin getestet wurden, eine gleichzeitige Betrachtung fand jedoch meist nicht statt.

Bei diesen Untersuchungen wurde zudem zumeist die Effektivität der Kombinationstherapie bei der Kryptokokkose beschrieben. Bei der *Cryptococcus*-Pneumonie konnte YAMAMOTO (1997) in der Kombinationstherapie von Fluconazol mit Flucytosin einen Synergismus bei 32 % der Patienten (n = 8/25) verzeichnen. JUST-NÜBLING (1994) berichtet bei Behandlung mit einer Tripel-Therapie aus Amphotericin B, Fluconazol und Flucytosin über eine Heilung der *Cryptococcus*-Meningitis bei über 80 % der untersuchten Fälle (n = 18/22). In der Untersuchung von LARSEN (1994) konnten Kryptokokken bei der *Cryptococcus*-Meningitis nach einer zehnwöchigen Kombinationstherapie mit Fluconazol und Flucytosin in 75 % der Fälle nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Therapieerfolge sind vor allem unter dem Aspekt erwähnenswert, dass die HIV-assoziierte Kryptokokkose in Deutschland bei etwa 5 % der AIDS-Patienten gesehen wird (MÜLLER 1994). BÜCHNER et al. (2002) dagegen befürworten, dass Flucytosin bei Hochrisiko-Patienten mit schweren *Candida*-Infektionen sowohl mit Amphotericin B als auch mit Fluconazol kombiniert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Kreuztitration 29 in der Breakpoint-Testung-resistente *Candida tropicalis*-Stämme hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol und Flucytosin getestet.

Kein Isolat der untersuchten *Candida tropicalis*-Stämme war in der Kombination von Flucytosin und Fluconazol nach 48 Stunden als resistent zu bezeichnen (MHK \leq 32 mg/l). Damit ließ sich in der Kombinationstestung eine Hemmung des Hefewachstums bei den *Candida tropicalis*-Stämmen feststellen, die in der Monotherapie entweder gegenüber einem oder sogar gegenüber beiden getesteten Antimykotika resistent waren.

In der Kombinationstestung waren sowohl gegenüber Flucytosin als auch gegenüber Fluconazol der Modalwert (Mode) und die MHK50 in beiden verwendeten Medien relevant niedriger. Der Modalwert in der Kreuztitration

konnte für die beiden getesteten Antimykotika bei den geringsten Konzentrationen, die getestet wurden, festgelegt werden (Mode FCY: $\leq 0,0625$ mg/ml, Mode FLC: $\leq 0,5$ mg/ml). Allerdings sank der Prozentanteil der Isolate mit diesem Verhalten für Flucytosin von 86,2 % nach 24 Stunden auf 31 % nach 48 Stunden und für Fluconazol von 44,8 % nach 24 Stunden auf 27,6 % nach 48 Stunden. Dieses Ergebnis unterstreicht erneut o.g. Forderung, zur erweiterten Empfindlichkeitstestung eine Inkubationszeit von 48 Stunden zu wählen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass in der Kombination deutlich niedrigere MHK-Werte erzielt werden konnten. Diese Beobachtung war unabhängig davon, ob die Isolate gegenüber einem oder beiden Antimykotika resistent waren. Es waren in der Kombinationstestung wesentlich niedrigere Konzentrationen des jeweiligen Antimykotikums zur Wachstumshemmung der *Candida tropicalis*-Stämme notwendig als die Konzentrationen, die bei der Monotherapie benötigt wurden.

Auch der Einsatz von unterschiedlichen Kulturmedien hatte in der vorliegenden Arbeit einen Einfluss auf die Ergebnisse der Breakpoint-Testung und der Kreuztitration. Zunächst wurden in der Breakpoint-Testung mit RPMI1640 2,0 % Glucose, RPMI1640 0,2 % und YST-Medium drei verschiedene Kulturmedien eingesetzt. Da jedoch kaum Veränderungen im Wachstumsverhalten bei Verwendung der RPMI-Medien in der Breakpoint-Testung nachgewiesen werden konnten, wurde in der Kreuztitration darauf verzichtet.

In der Kreuztitration der 29 selektierten *Candida tropicalis*-Stämme konnte für Flucytosin und Fluconazol in alleiniger Testung ein geringgradig verändertes Verteilungsmuster mit einer Verschiebung zu höheren MHK-Werten bei den sensiblen Stämmen beobachtet werden, die sich jedoch als nicht signifikant erwiesen. Bei den resistenten Stämmen entsprach sich der Anteil der Isolate für die jeweiligen Antimykotika zu den entsprechenden Auswertzeitpunkten. Untersuchte man die beiden Antimykotika jedoch gemeinsam, konnte im YST-Medium gegenüber Flucytosin nach 48 Stunden eine deutlich höhere Anzahl an

Stämmen mit einer KT-MHK von $\leq 0,0625$ mg/l nachgewiesen werden als unter Verwendung von RPMI1640. Die Verteilungsunterschiede der KT-MHK-Ergebnisse gegenüber Fluconazol erwiesen sich wiederum im Vergleich der beiden Medien als nicht signifikant.

RODRIGUEZ-TUDELA (1995) berichtet vor allem bei Fluconazol über erhöhte MIC50- und MIC90-Werte bei Verwendung von RPMI1640 als bei Einsatz von RPMI1640 2 % Glucose. Auch bei den Antimykotika Anidulafungin und Caspofungin konnten höhere MHK-Werte in RPMI 2 % Dextrose als in RPMI1640 mit 0,2 % Glucose gefunden werden (ESPINEL-INGROFF 2003).

Durch die Ermittlung des Fractional Inhibitory Concentration-Index (FIC-Index) erfolgt eine qualitative Einordnung des Wachstumsverhaltens von Hefen bei einer Kombinationstherapie.

In der Kreuztitration waren in beiden Medien Isolate vorhanden, die der qualitativen FIC-Index-Bewertung „Antagonismus“ zugeordnet wurden. Im Medium RPMI1640 2 % Glucose zeigte sich bei insgesamt 7 von 29 Isolaten ein antagonistischer Effekt. Im YST-Medium waren vier Isolate mit einem antagonistischen Verhalten zu verzeichnen. Betrachtet man jedoch die MHK-Werte von Flucytosin und Fluconazol bei den Stämmen mit einem qualitativen antagonistischen FIC-Index, so ist festzustellen, dass für Flucytosin in der alleinigen Testung von Flucytosin alle Stämme mit Ausnahme von zwei Isolaten, die als intermediär eingestuft wurden, resistent waren. Die MHK-Werte gegenüber Fluconazol hingegen lagen zwar in der Regel höher als die MHK-Werte bei der Testung gegenüber Fluconazol allein. Jedoch konnten ähnlich wie bei der alleinigen Testung von Fluconazol, bei der alle Stämme im sensiblen Bereich lagen, bis auf einen Stamm, der intermediär war, alle Stämme als sensibel bezeichnet werden. Für die Einstufung der Ergebnisse der Kombinationstestung in die qualitative FIC-Index-Gruppe mit antagonistischem Verhalten waren damit immer die FIC-Werte von Fluconazol entscheidend, d.h. die Veränderung der MHK lag im Bereich von Fluconazol. Von einem klinisch relevanten Antagonismus ist daher nicht auszugehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Untersuchung der 29 *Candida tropicalis*-Stämme vor allem Addition und Synergismus beobachtet werden.

Ein additiver Effekt fand sich nach 48 Stunden Inkubationszeit bei jeweils 6 Isolaten in RPMI 2 % Glucose und YST-Medium. Ein Synergismus konnte nach 48 Stunden bei 11 Stämmen im RPMI- und bei 15 Stämmen im YST-Medium festgestellt werden. Bei den Stämmen, die entweder nur gegen Fluconazol oder nur gegen Flucytosin resistent waren, dominierte ein additives Verhalten. Dagegen herrschte bei den Isolaten, die gegenüber beiden Antimykotika in der Monotherapie ein resistentes Wachstumsverhalten gezeigt hatten, der Synergismus vor.

Besonders gegenüber Flucytosin konnte in der Kreuztitration eine Verringerung der MHK beobachtet werden. Bei manchen der 29 *C. tropicalis*-Isolaten lag die MHK für Flucytosin in der Kombination bei $\leq 0,0625$ mg/L, obwohl Flucytosin bei alleiniger Gabe gegenüber dem untersuchten Stamm ein resistentes Wachstumsverhalten gezeigt hatte. Bei diesen Stämmen sollte eine alleinige Wirkung von Fluconazol angenommen werden. Bezogen auf die antimykotische Wirkung von Flucytosin in der Kombinationstestung kann hingegen von einem synergistischen Effekt ausgegangen werden, wenn der FIC-Index $< 0,5$ war und die die FCY-MHK in der Kreuztitration größer als die niedrigste untersuchte FCY-Konzentration war.

Der FIC-Index wird in wissenschaftlichen Studien genutzt, um Interaktionsmechanismen zu beschreiben. Die Literaturangaben sind zu den qualitativen Effekten einer Kombinationstherapie sehr uneinheitlich.

TE DORSTHORST (2002) beschreibt in einer Studie mit 35 Hefestämmen (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* und *Cryptococcus neoformans*) in der Mehrheit der Fälle einen Antagonismus. BARCHIESI (2007) und OLIVEIRA (2005) beobachteten dagegen keinen antagonistischen Effekt. OLIVEIRA (2005) fand unter Verwendung von Caspofungin und Posaconazol bei *C. glabrata*-Isolaten in 82 % der Fälle eine Indifferenz, der Prozentanteil der Isolate mit Synergismus lag bei 18 %. BARCHIESI (2007) fand in einer Kombinationstherapie von *Candida parapsilosis*-Stämmen mit Caspofungin und

Amphotericin B ausschließlich indifferentes Verhalten. GHANNOUM (1995) konnte ebenfalls sowohl für *Cryptococcus neoformans* als auch für *C. albicans* nur einen indifferenten Effekt bei einem kombinierten Einsatz von Flucytosin und Fluconazol beobachten. Im Tiermodell mit Mäusen beschreibt GRAYBILL (1996) vor allem additive Effekte in der Kombinationstherapie. Jedoch geht aus seiner Arbeit nicht hervor, welche *Candida*-Spezies verwendet wurden. MIKAMI (1992) und SCALARONE (1991) beobachteten dagegen Synergismus zwischen Flucytosin und Fluconazol gegenüber *C. albicans*. Auch SASAKI (2000) wies synergistisches Verhalten bei *Candida albicans*-Isolaten unter Gabe von Ofloxacin und Fluconazol im Mausmodell nach. Diese Ergebnisse entsprechen denen von POLAK (1987) für die Candidiasis, bei der Kryptokokkose und Aspergillose sei jedoch ein indifferentes Verhaltensmuster zu beobachten. Für die Kryptokokkose sah NGUYEN in zwei Studien aus den Jahren 1995 und 1997 jedoch Synergismus in bis zu 62 % der untersuchten *Cryptococcus*-Isolate; ein Antagonismus wurde dagegen auch hier nicht beschrieben.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Literaturangaben mit denen der vorliegenden Arbeit gestaltet sich somit schwierig, da die untersuchten Kollektive sich sehr voneinander unterscheiden. Zudem muss zwischen Studien unterschieden werden, die *in vitro* durchgeführt wurden und denen, die sich des Tiermodells bedienen.

Problematisch ist vor allem, dass sich die qualitative Einordnung des FIC-Index unterscheidet (BARCHIESI 2005). Die qualitative FIC-Index-Bewertung „Addition“ ist bei den meisten Autoren nicht definiert. Vor allem wird jedoch im Gegensatz zur vorliegenden Studie ein antagonistischer Effekt erst bei FIC-Index-Werten von $\geq 4,0$ festgelegt (BARCHIESI 2005, BARCHIESI 2007, OLIVEIRA 2005) (vorliegende Studie FIC-Index $\geq 2,0$). Bei Definition eines antagonistischen Effektes ab einem FIC-Index von $\geq 4,0$ in der vorliegenden Arbeit würden sich bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden die in diese Gruppe einzuordnenden Isolate im RPMI-Medium von 5 auf 4 Stämme und im YST-Medium von 2 auf 0 Stämme verringern. Diese Verschiebung zu einem höheren Grenzwert ist daher zur Beurteilung der klinischen Relevanz vermutlich

realistischer. Die Bestimmung des FIC-Index ist damit in der Beurteilung qualitativer Interaktionsmechanismen eine Orientierungshilfe, deren Aussagen kritisch hinterfragt werden müssen. Die Bewertung der Kreuztitration-MHK-Werte der einzelnen Antimykotika an den therapeutischen Breakpoints der S-I-R-Bewertung ist hier ein hilfreiches Vorgehen.

In der vorliegenden Untersuchung konnte zudem eine Beeinflussung der Ergebnisse der Kreuztitration einerseits durch die Länge der Inkubationszeit sowie durch die Art des Testmediums festgestellt werden. Diese Veränderungen waren jedoch Stamm-bezogen und nicht genereller Natur.

Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Problematik der endgültigen MHK-Festlegung bei Fluconazol, da bei den Azol-Antimykotika bei manchen Hefen nur eine Partialinhibition erzielt wird (ANAISSIE 1996-b). Zudem scheint es stammspezifische Unterschiede zu geben, da nicht bei allen Hefen dieselbe Ausprägung des partialinhibitorischen Effektes gefunden werden konnte (RODRIGUEZ-TUDELA 1994). Dies drückt sich dann als Trailing- oder Persisting-Effekt bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) aus und bereitet Probleme bei der MHK-Festlegung. Die klinisch-therapeutische Bedeutung dieser Wachstumsphänomene ist noch ungeklärt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in der vorliegenden Untersuchung kein klinisch bedeutsamer Antagonismus, jedoch ein relevanter Synergismus in der Kombinationstestung von Fluconazol und Flucytosin bei *C. tropicalis*-Stämmen nachweisbar war, die gegenüber einer Monotherapie der beiden Antimykotika teilweise oder vollständig resistent sind. Die Empfindlichkeit von *C. tropicalis* scheint zudem mit den qualitativen Ergebnissen des FIC-Index zu korrelieren.

Die von WEGMANN (1994) postulierten Anforderungen einer effizienten Kombinationstherapie scheint die Kombination Fluconazol und Flucytosin für *C. tropicalis* in vitro zu erfüllen. Alle Isolate des Kontrollkollektives bei denen in der alleinigen Testung der Antimykotika ein oder beide Antimykotika resistent waren, erwiesen sich in der Kombinationstestung als sensibel.

Es konnte ein relevanter Synergismus von Fluconazol und Flucytosin nachgewiesen werden. Beide Substanzen sind liquorgängig, hämodialysierbar und auch für Kinder relativ gut verträglich. Durch ihre niedrige Nephrotoxizität stellen sie bei Beachtung der Flucytosin-Spiegel bei *C. tropicalis*-Infektionen eine initiale Therapiealternative gegenüber Amphotericin B dar.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint die Kombinationstherapie von Fluconazol und Flucytosin eine wirksame Alternative in der Behandlung systemischer Candidosen zu sein. Die Effizienz einer Kombinationstherapie mit Fluconazol und Flucytosin in vivo sowie die Empfindlichkeit anderer *Candida*-Spezies gegenüber der untersuchten Kombination bedürfen aber einer weiteren wissenschaftlichen Abklärung.

6 Zusammenfassung

Candida (C.) tropicalis gehört zu den häufigsten Erregern von System- und Organmykosen weltweit und ist auf Grund der unterschiedlichen Empfindlichkeit den Antimykotika gegenüber häufig mit einer hohen Letalität verbunden. Mittels eines Suchtestes (Breakpointtest) wurden daher die Empfindlichkeitsverteilungen von 273 unselektionierten *C. tropicalis*-Isolaten der mykologischen Routinediagnostik gegenüber den Antimykotika Flucytosin (FCY), Fluconazol (FLC) und Voriconazol (VOR) ermittelt und analysiert. In Hinsicht auf eine mögliche Kombinationstherapie von FCY und FLC wurde das in-vitro-Empfindlichkeitsverhalten von 29 *C. tropicalis*-Isolaten, die gegenüber einem oder beiden Antimykotika resistent waren, mittels Kreuztitrationstestung (Checkerboard-Technik) modellhaft untersucht und anhand des Fractional Inhibitory Concentration-Index (FIC-Index) analysiert. Die Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an das NCCLS M27 A-Protokoll (Medium: RPMI 1640 2 % Glucose) und wurden für die Kreuztitration ebenfalls nach DIN 58940-84 (YST-Medium) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach einer Inkubationszeit (37° C) von 24 und 48 Stunden visuell. In der Breakpointtestung erwiesen sich von den 273 *C. tropicalis*-Isolaten (100 %) nach 48 h gegenüber FCY 55,3 %, FLC 81 % und VOR nach CLSI-Breakpoints 71,4 % als sensibel. Eine weitergehende Beurteilung von Voriconazol war nicht möglich, da die nach Abschluss der Untersuchung eingeführten CLSI-Breakpoints teilweise oberhalb der untersuchten Voriconazolkonzentrationen lagen. Für Flucytosin zeigte sich nach 48 h eine bimodale Empfindlichkeitsverteilung mit einem sensiblen Anteil von 55,3 % und einem resistenten von 41,4 % der Isolate. Eine relevante inkubationszeitabhängige Empfindlichkeitsveränderung mit mehr als einer Konzentrationsstufe im Breakpointtest, trat bei FCY in 0,4 %, bei FLC in 6,6 % und bei VOR in 20,9 % der Isolate auf. Ein Ausschluss von Stämmen für eine erweiterte Empfindlichkeitsbestimmung sollte daher frühestens nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden erfolgen. In der Empfindlichkeitsmusteranalyse (EMA) für FCY und FLC auf der Basis der 48 h-Ergebnisse zeigte sich, dass nur 6,2 % der Isolate oberhalb der größten getesteten

Breakpointkonzentrationen für FCY (> 25 mg/l) und FLC (> 8 mg/l) lagen, wohingegen dies bei alleiniger Testung für FCY 41,4 % und FLC 12,8 % der Isolate waren.

In der Kreuztitration waren in beiden Medien Isolate mit der qualitativen FIC-Index-Bewertung „Antagonismus“ (in RPMI siebenmal, in YST-Medium viermal) vorhanden. Die MHK-Werte der Kombinationstestung wiesen jedoch alle diese Isolate als sensibel bzw. intermediär sensibel aus. Von einem klinisch relevanten Antagonismus ist daher nicht auszugehen. Ein additiver bzw. synergistischer Effekt fand sich nach 48 Stunden in RPMI bei 6 / 11 und in YST-Medium bei 6 / 15 der 29 Isolate.

Die in vitro-Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf die erweiterten Therapiemöglichkeiten mit der Kombination von Flucytosin und Fluconazol hin. Gleichzeitig zeigen sie aber auch, dass das qualitative Ergebnis „Antagonismus“ des FIC-Index an der Einstufung der entsprechenden MHK-Werte auf seine klinische Bedeutung zu hinterfragen ist.

7 Literaturverzeichnis

1. ALEXANDER, J.W.; OGLE, C.K.; STINNETT, J.D. (1978)
A sequential, prospective analysis of immunologic abnormalities and infection following severe thermal injury
Ann Surg 188, 809–816
2. ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA–ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ–TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. (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
3. ALOIA, T.; SOLOMKIN, J.; FINK, A.S.; NUSSBAUM, M.S.; BJORNSON, S.; BELL, R.H.; SEWAK, L.; McFADDEN, D.W. (1994)
Candida in Pancreatic Infection: A Clinical Experience
Am Surg 60, 793–796
4. ANAISSIE, E.J.; PINCZOWSKI, H. (1993)
Invasive Candidiasis during granulocytopenia
Recent Results Cancer Res 132, 137–145
5. ANAISSIE, E.J.; VARTIVARIAN, S.E.; ABI–SAID, D.; UZUN, O.; PINCZOWSKI, H.; KONTOYIANNIS, D.P.; KHOURY, P.; PAPADAKIS, K.; GARDNER, A.; RAAD, I.I.; GILBREATH, J. (1996–a)
Fluconazole versus Amphotericin B in the treatment of hematogenous candidiasis
Am J Med 101, 170–176

6. ANAISSIE, E.J.; DAROUICHE, R.O.; ABI-SAID, D.; UZUN, O.; MERA, J.; GENTRY, L.O.; WILLIAMS, T.; KONTOYIANNIS, D.P.; KARL, C.L.; BODEY, G.P. (1996–b)
Management of invasive *Candidal* infections: Results of a prospective, randomized, multicenter study of Fluconazole versus Amphotericin B and review of the literature
Clin Infect Diseases 23, 964–972
7. ANG, B.S.P.; TELENTI, A.; KING, B (1993)
Candidemia from a urinary tract source: microbiological aspects and clinical significance
Clin Infect Dis 17, 662–666
8. AUGER, P. ; DUMAS, C. ; JOLY, J. (1979)
A study of 666 strains of *Candida albicans*: Correlation between serotype and susceptibility to 5–Fluorocytosine
J Infect Dis 139, 590–594
9. BADDOUR, L.M. (1995)
Long–term suppressive therapy for *Candida parapsilosis* induced prosthetic valve endocarditis
Mayo Clin Proc 70, 773–775
10. BANERJEE, S.N.; EMORI, T.G.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P.; JARVIS, W.R.; HORAN, T.; EDWARDS, J.R.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; MARTONE, W.J.; NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM (1991)
Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980–1989. National Nosocomial Infections Surveillance System
Am J Med 91, 86S–89S
11. BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; FOTHERGILL, A.; ARZENI, D.; GREGANTI, G.; GIANNINI, D.; RINALDI, M.G.; SCALISE, G. (2005)
Caspofungin in combination with Amphotericin B against *Candida glabrata*
Antimicrob Agents Chemother 49, 2546–2549

12. BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; TOMASSETTI, S.; GIANNINI, D.; SCALISE, G. (2007)
Caspofungin in combination with Amphotericin B against *Candida parapsilosis*
Antimicrob Agents Chemother 51, 941–945
13. BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. (1983)
Yeasts: Characteristics and identification
Cambridge, Cambridge University Press
14. BAYER, A.S.; BLUMENKRANTZ, M.J.; MONTGOMERIE, J.Z.; GALPIN, J.E.; COBURN, J.W.; GUZE, L.B. (1976)
Candida peritonitis. Report of 22 cases and review of the English literature
Am J Med 61, 832–840
15. BECK–SAGUE, C.; JARVIS W.R. (1993)
Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States; 1980–1990. National Nosocomial Infection Surveillance System
J Infect Dis 167, 1247–1251
16. BEDINI, A. ; VENTURELLI, C. ; MUSSINI, C. ; GUARALDI, G.; CODELUPPI, M.; BORGHI, V.; RUMPIANESI, F.; BARCHIESI, F.; ESPOSITO, R. (2006)
Epidemiology of Candidaemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary–care hospital
Clin Microbiol Infect 12, 75–80
17. BERENQUER, J.; FERNANDEZ–BACA, V.; SANCHEZ, R.; BOUZA, E. (1995)
In vitro activity of Amphotericin B, Flucytosine and Fluconazole against yeasts causing bloodstream infections
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 14, 362–365

18. BJERKNES, R.; VINDENES, H. (1989)
Neutrophilic dysfunction after thermal injury: alteration of phagolysosomal acidification in patients with large burns
Burns 15, 77–81
19. BODEY, G.P.; ANAISSIE, E.J.; ELTING, L.S.; ESTEY, E.; O'BRIEN, S.; KANTARJIAN, H. (1994)
Antifungal prophylaxis during remission induction therapy for acute leukemia– Fluconazol versus intravenous Amphotericin B
Cancer 73, 2100–2106
20. BÖHME, A.; RUHNKE, M.; BUCHHEIDT, D.; KARTHANUS, M.; EINSELE, H.; GUTH, S.; HEUSSEL, G.; HEUSSEL, C.P.; JUNGHANSS, C.; KERN, W.K.; KUBIN, T.; MASCHMEYER, G.; SEZER, O.; SILLING, G.; SUDHOFF, T.; SZELENYI DAGGER, H.; ULLMANN, A.J.; INFECTIOUS DISEASES WORKING PARTY (AGIHO) OF THE GERMAN SOCIETY OF HEMATOLOGY AND ONCOLOGY (DGHO) (2003)
Treatment of fungal infections in haematology and oncology– guidelines of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO)
Ann Hematol 82 (Supplement 2), 133–140
21. BORG–VON ZEPPELIN, 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
22. BOUCHER, H.W.; GROLL, A.H.; CHIOU, C.C.; WALSH, T.J. (2004)
Newer systemic antifungal agents: pharmacokinetics, safety and efficacy
Drugs 64, 1997–2020

23. BRADLEY, J.A.; HAMILTON, D.N.; BROWN, M.W.; CANCE, W.; JACKSON, V.S.; LEDINGHAM, I.M. (1984)
Cellular defense in critically ill surgical patients
Crit Care Med 12, 565–570
24. BÜCHNER, T.; FEGELER, W.; BERNHARDT, H.; BROCKMEYER, N.; DUSWALD, K.H.; HERRMANN, M.; HEUSER, D.; JEHN, U.; JUST-NUBLING, G.; KARTHAUS, M.; MASCHMEYER, G.; MÜLLER, J.; RITTER, J.; ROOS, N.; RUHNKE, M.; SCHMALRECK, A.; SCHWARZE, R.; SCHWESINGER, G.; SILLING, G.; PANEL OF INTERDISCIPLINARY INVESTIGATORS
Treatment of severe *Candida* infections in high-risk patients in Germany: Consensus formed by a panel of interdisciplinary investigators
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21, 337–352
25. CALANDRA, T.; BILLE, J.; SCHNEIDER, R.; MOSIMANN, F.; FRANCIOLI, P. (1989)
Clinical significance of *Candida* isolated from peritoneum in surgical patients
Lancet 2, 1437–1440
26. CALDERONE, R.A. (1989)
Host parasite relationships in Candidiasis
Mycoses 32 (Supplement 2), 12–17
27. CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. (2001)
Virulence factors of *Candida albicans*
Trends in Microbiology 9, 327–335
28. CASTALDO, P.; STRATTA, R.J.; WOOD, R.P. (1991)
Clinical spectrum of fungal infections after orthotopic liver transplantation
Arch Surg 126, 149–156

29. CHENG, I.K.P.; FANG, G.X.; CHAN, T.M.; CHAN, M.K. (1989)
Fungal peritonitis complicating peritoneal dialysis: report of 27 cases and review of treatment
Quart J Med 71, 265
30. CHOWDHARY, A.; BECKER, K.; FEGELER, W.; GUGNANI, H.C.; KAPOOR, L.; RANDHAWA, V.S.; MEHTA, G. (2003)
An outbreak of Candidemia due to *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit
Mycoses 46, 287–292
31. CHRISTENSON, J.C.; GURUSWAMY, A.; MUKWAYA, G.; RETTIG, P.J. (1987)
Candida lusitanae: an emerging pathogen
Pediatr Infect Dis 6, 755–757
32. CHUN, C.H.; RAFF, M.J.; CONTRERAS, L.; VARGHESE, R.; WATERMAN, N.; DAFFNER, R.; MELO, J.C. (1980)
Splenic abscess
Medicine (Baltimore) 59, 50–65
33. COLE, G.T.; HALAWA, A.A.; ANAISSIE, E.J. (1996)
The role of the gastrointestinal tract in hematogeneous Candidiasis: from the laboratory to the bedside
Clin Infect Dis 22 (Supplement 2), 73–88
34. COMO, J.A.; DISMUKES, W.E. (1994)
Oral azole drugs as systemic antifungal therapy
N Engl J Med 330, 263–272
35. CUENCA-ESTRELLA, M.; RODERO, L.; GARCÍA-EFFRÓN, G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. (2002)
Antifungal susceptibilities of *Candida spp.* isolated from blood in Spain and Argentina, 1996–1999
J Antimicrobiol Chemother 49, 981–987
36. DEAN, D.A.; BURCHARD, K.W. (1996)
Fungal infections in surgical patients
Am J Surg 171, 374–382

37. DEBRUYNE, D.; RYCKELYNCK, J.P. (1993)
Clinical pharmacokinetics of Fluconazole
Clin Pharmacokinet 24, 10–27
38. DEI-CAS, E.; DUJARDIN, L.; RIBEIRO PINTO, M.E.; AJANA, F.; FRUIT, J.; POULAIN, D.; CAMUS, D.; VERNES, A. (1991)
Kinetic study of antifungal activity of Amphotericin B, 5-Fluorocytosine and Ketoconazole against clinical yeast isolates using liquid-phase turbidimetry
Mycoses 34, 167–172
39. DEITCH, E.A. (1990)
The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure
Arch Surg 125, 403–404
40. DERMOUMI, H. (1982)
Antimykotika–Empfindlichkeit bei klinisch bedeutsamen Hefen und Schimmelpilzen im Hemmhofstest
Mykosen 23, 1–9
41. DERMOUMI, H. (1992)
In vitro susceptibility of yeast isolates from the blood to Fluconazole and Amphotericin B
Chemotherapy 38, 112–117
42. DIN 58940–81 (2002)
Medizinische Mikrobiologie – Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Teil 84: Mikrodilution – Spezielle Anforderungen an die Testung von Pilzen gegen Antimykotika
Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin
43. DUPONT, B.F.; DROMER, E.; IMPROVISI, L. (1996)
The problem of azole resistance in *Candida*
J Mycol Med 6 (Supplement 2), 12

44. EDWARDS, J.E.; FILLER, S.G. (1992)
Current strategies for treating invasive Candidiasis: emphasis on infections in non–neutropenic patients
Clin Infect Dis 14 (Supplement 1), 106–113
45. ELLEPOLA, A.N.; SAMARANAYAKE, L.P. (2000)
Oral *Candidal* infections and antimycotics
Crit Rev Oral Biol Med 11, 172–198
46. ELLIS, M.; SPENCE, D.; DE PAUW, B.; MEUNIER, F.; MARINUS, A.; COLLETTE, L.; SYLVESTER, R.; MEIS, J.; BOOGAERTS, M.; SELLESLAG, D.; KREMERY, V.; VON SINNER, W.; MacDONALD, P.; DOYEN, C.; VANDERCAM, B. (1998)
An EORTC international multicenter randomized trial (EORTC number 19923) comparing two dosages of liposomal Amphotericin B for treatment of invasive Aspergillosis
Clin Infect Dis 27, 1406–1412
47. EORTC (International Antimicrobial Therapy Cooperative Group) (1989)
Empiric antifungal therapy in febrile granulocytopenic patients
Am J Med 86, 668–672
48. ESPINEL–INGROFF, A. (2003)
In vitro antifungal activities of Anidulafungin and Micafungin, licensed agents and the investigational triazole Posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature
Rev Iberoam Micol 20, 121–136
49. FEGELER, W. (1986)
Diagnosis of deep and systemic fungal infections
In: SIMON, C.; WILKINSON, P. (eds.) Diagnosis of infectious diseases – New aspects, 397–411
Schattauer Verlag, Stuttgart/ New York

50. FEGELER, W.; LINTZ, D.; RITZERFELD, W. (1988)
Resistance–pattern–analysis – a step toward predictable differentiated antibiotic therapy
Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 270, 153–159
51. FEGELER, W. (1993)
Aspekte zur Diagnostik und Frühdiagnostik von Organ– und Systemmykosen
In: HEIZMANN, W.R. (Hrsg.): Systemische Pilzinfektionen, 15–31
Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
52. FEGELER, W. (1994)
Aspekte zur Diagnostik tieflokalisierter, opportunistischer Mykosen
Mycoses 37 (Supplement 2), 8–19
53. FEGELER, W. (1995)
Zur Epidemiologie von System– und Organmykosen
Pilzdialog 10, 13–14
54. FEGELER, W. (1997)
Evaluation eines Breakpoint–Testes zur Empfindlichkeitsprüfung an Hefen gegenüber Fluconazol
Mycoses 40 (Supplement 1), 47–52
55. FIDEL, P.L.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. (1999)
Candida galbrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*
Clin Microbiol Rev 12, 80–96
56. FILLER, S.G.; EDWARDS, J.E. (1995)
When and how to treat serious *Candida* infections: concepts and controversies
Curr Clin Topics Infect Dis 15, 1
57. 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 Antimicrobiol Chemother 59, 767–771

58. FRATTARELLI, D.A.; REED, M.D.; GIACOIA, G.P.; ARANDA, J.V. (2004)
Antifungals in systemic neonatal Candidiasis
Drugs 64, 949–968
59. GALLIS, H.A. (1996)
Amphotericin B: A commentary on its role as an antifungal agent and as a comparative agent in clinical trials
Clin Infect Dis 22, Supplement 2, 145–147
60. GEMEINHARDT, H. (1976)
Endomykosen des Menschen, 156–157
München, Fischer Verlag
61. GEORGOPAPADAKOU, N.H.; WALSH, T.J. (1996)
Antifungal agents: Chemotherapeutic targets and immunologic strategies
Antimicrob Agents Chemother 40, 279–291
62. GERMAUD, P.; MORIN, O. (2004)
New antifungal agents and bronchopulmonary mycoses
Rev Pneumol Clin 60, 139–144
63. GHANNOUM, M.A.; ABU-ELTEEN, K.H. (1990)
Pathogenicity determinants of *Candida*
Mycoses 33, 265–282
64. GHANNOUM, M.A.; FU, Y.; IBRAHIM, A.S.; MORTARA, L.A.; SHAFIQ, M.C.; EDWARDS, J.E. JR; CRIDDLE, R.S. (1995)
In vitro determination of optimal antifungal combinations against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*
Antimicrob Agents Chemother 39, 2459–2465
65. GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A. (1996)
Epidemiology, diagnosis, and therapy of fungal infections in surgery
Infect Control Hosp Epidemiol 17, 558–564

66. GIRMENIA, C.; PAGANO, L.; LEONE, G. (2001)
Fluconazole and *Candida krusei* fungemia
Arch Intern Med 161, 2267–2269
67. GOFF, D.A.; KOLETAR, S.L.; BUESCHING, W.J.; BARNISHAN, J.;
FASS, R.J. (1995)
Isolation of fluconazole-resistant *Candida albicans* from human
immunodeficiency virus-negative patients never treated with
azoles
Clin Infect Dis 20, 77–83
68. GRAYBILL, J.R. (1996)
The future of antifungal therapy
Clin Infect Dis 22 (Supplement 2), 166–178
69. GUPTA, A.K.; TOMAS, E. (2003)
New antifungal agents
Dermatol Clin 21, 565–576
70. HARON, E.; VARTIVARIAN, S.; ANAISSIE, E.; DEKMEZIAN, R.;
BODEY, G.P. (1993)
Primary *Candida* pneumonia: experience at a large cancer center
and review of the literature
Medicine (Baltimore) 72, 137–142
71. HAY, R.J. (1991)
Overview of the treatment of disseminated fungal infections
J Antimicrob Chemother 28 (Supplement B), 17–25
72. HEDDERICK, S.A.; LYONS, M.J.; LIU, M. (2000)
Epidemiology of yeast colonization in the intensive care unit
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19, 663 – 670
73. HEIZMANN, W.R. (1993)
Pilzinfektionen bei immunsupprimierten Patienten
In: HEIZMANN, W.R. (Hrsg.): Systemische Pilzinfektionen, 15–31
Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

74. HERRMANN, J. (1993)
Pilzinfektionen: Indikation, Probeentnahme, Transport und
Verarbeitung im Laboratorium
In: HEIZMANN, W.R. (Hrsg.): Systemische Pilzinfektionen, 129–
142
Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
75. HIEMENZ, J.W.; WALSH, T.J. (1996)
Lipid formulations of Amphotericin B: Recent progress and future
directions
Clin Infect Dis 22 (Supplement 2), 133–144
76. HITCHCOCK, C.A. (1993)
Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents
Biochem Soc Trans 21, 1039–1047
77. HOLZHEIMER, R.G.; QUOIKA, P.; PÄTZMANN, D.; FUSSELE, R. (1990)
Nosocomial infections in general surgery: surveillance report from
a German university clinic
Infection 18, 219–225
78. HOLZHEIMER, R.G.; DRALLE, H. (2002)
Management of mycoses in surgical patients – review of the
literature
Eur J Med Res 7, 200–226
79. HUGHES, C.E.; BENNETT, R.L.; TUNA, I.C.; BEGGS, W.H. (1988)
Activities of Fluconazole (UK 49, 858) and Ketoconazole against
Ketoconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans*
Antimicrob Agents Chemother 32, 209–212
80. HUMMEL, M.; THALMANN, U.; JAUTZKE, G.; STAIB, F.; SEIBOLD, M.;
HETZER, R. (1992)
Fungal infections following heart transplantation
Mycoses 35, 23–34

81. IKEDA, K.; YAMASHITA, J.; FUJISAWA, H.; FUJITA, S. (1990)
Cerebral granuloma and meningitis caused by *Candida albicans*:
useful monitoring of mannan antigen in cerebrospinal fluid
Neurosurgery 26, 860–863
82. IMBERT–BERNHARD, C.; VALENTIN, A.; REYNES, J.; MALLIÉ, M.;
BASTIDE, J.M. (1994)
Relationship between Fluconazole sensitivity of *Candida albicans*
isolates from HIV positive patients and serotype, adherence and
CD4+ lymphocyte count
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13, 711–716
83. INONE, S.; WIRMAN, J.A.; ALEXANDER, J.W. et al. (1988)
Candida albicans translocation across the gut mucosa following
burn injury
J Surg Res 44, 479–492
84. JEHN, U. (1997)
Klinische Mykologie – Leitfaden für die interdisziplinäre Praxis
Landsberg, eco med
85. JEU, L.; PIACENTI, F.J.; LYAKHOVETSKIY, A.G.; FUNG, H.B. (2003)
Voriconazole
Clin Ther 25, 1321–1381
86. JUST–NÜBLING, G. (1994)
Die Therapie der Candidose und der Cryptococcose bei AIDS
Mycoses 37 (Supplement 2), 56–63
87. KAPPE, R.; SONNTAG, H.G. (1993)
Immunologische Abwehrmechanismen gegen tiefe Pilzinfektionen
In: HEIZMANN, W.R. (Hrsg.) Systemische Pilzinfektionen, 93–105
Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
88. KAUFFMAN, C.A.; CARVER, P.L. (1997)
Antifungal agents in the 1990s. Current status and future
developments
Drugs 53, 539–549

89. KAUFFMAN, C.A. (2001)
Fungal infections in older adults
Clin Infect Dis 33, 550–555
90. KIRKPATRICK, C.H. (1984)
Host factors in defense against fungal infections
Am J Med 77, 1–12
91. KONTOYIANNIS, D.P.; LUNA, M.A.; SAMUELS, B.I.; BODEY, G.P. (2000)
Hepatosplenic candidiasis. A manifestation of chronic disseminated disease
Infect Dis Clin North Am 14, 721–739
92. KORTING, H.C. (2005)
Mykosen
In: BRAUN–FALCO, O.; PLEWIG, G.; WOLFF, H.H.; BURGDORF, W.H.C.; LANDTHALER, M. (Hrsg.) Dermatologie und Venerologie, 193–199
Heidelberg, Springer Medizin Verlag
93. KRAUSE, H. (1988)
Mykologische Diagnostik – Ein Leitfaden für die Praxis
Nürnberg, Sandoz AG
94. KUJATH, P.; KOCHENDÖRFER, P.; KREISKOTHER, E.; DAMMRICH, J. (1990)
Pilzperitonitis
Chirurg 61, 900–905
95. KUJATH, P.; LERCH, K.; KOCHENDÖRFER, P.; BOOS, C. (1993)
Comparative study of the efficacy of Fluconazole versus Amphotericin B/ Flucytosine in surgical patients with systemic mycoses
Infection 21, 376–382

96. LARSEN, R.A.; BOZZETTE, S.A.; JONES, B.E.; HAGHIGHAT, D.; LEAL, M.A.; FORTHAL, D.; BAUER, M.; TILLES, J.G.; McCUTCHAN, J.A.; LEEDOM, J.M. (1994)
Fluconazole combined with flucytosine for treatment of *Cryptococcal* meningitis in patients with AIDS
Clin Infect Dis 19, 741
97. LEWIS, R.E.; LUND, B.C.; KLEPSE, M.E.; ERNST, E.J.; PFALLER, M.A. (1998)
Assessment of antifungal activities of Fluconazole and Amphotericin B administered alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic in vitro mycotic infection model
Antimicrob Agents Chemother 42, 1382 – 1386
98. LODDER, J. (1971)
The Yeasts – a taxonomic study
Amsterdam/London, North-Holland Publishing Company
99. LOPES-BERESTEIN, G.; BODEY, G.P.; FAINSTEIN, V.; KEATING, M.; FRANKEL, L.S.; ZELUFF, B.; GENTRY, L.; MEHTA, K. (1989)
Treatment of systemic fungal infections with liposomal Amphotericin B
Arch Intern Med 149, 2533–2536
100. LORIAN, V. (1996)
Antibiotics in Laboratory Medicine
Williams & Wilkins, 438–441
101. LORTHOLARY, O.; CHARLESMAGNE, A.; BASTIDES, F.; CHEVALIER, P.; DATRY, A.; GONZALVES, M.F.; MICHEL, G.; TILLEUL, P.; VEBER, B.; HERBRECHT, R. (2004)
A multicentre pharmacoepidemiological study of therapeutic practices in invasive fungal infections in France during 1998–1999
J Antimicrob Chemother 54, 456–464

102. LOUIE, A.; LIU, W.; MILLER, D.A.; SUCKE, A.C.; LIU, Q.F.; DRUSANO, G.L.; MAYERS, M.; MILLER, M.H. (1999)
Efficacies of high-dose Fluconazole plus Amphotericin B and high-dose Fluconazole plus 5-Fluorocytosine versus Amphotericin B, Fluconazole, and 5-Fluorocytosine monotherapies in treatment of experimental endocarditis, endophthalmitis, and pyelonephritis due to *Candida albicans*
Antimicrob Agents Chemother 43, 2831–2840
103. LU, J.J.; LEE, S.Y.; CHIUEH, T.S. (2004)
In vitro antifungal susceptibility testing of *Candida* blood isolates and evaluation of the E-test method
J Microbiol Immunol Infect 37, 335–342
104. MacMILLIAN, B.G.; LAW, E.J.; HOLDER, I.A. (1972)
Experience with *Candida* infections in the burn patient
Arch Surg 104, 509–514
105. MAENZA, J.R.; MERZ, W.G.; ROMAGNOLI, M.J.; KERULY, J.C.; MOORE, R.D.; GALLANT, J.E. (1997)
Infection due to Fluconazole-resistant *Candida* in patients with AIDS: prevalence and microbiology
Clin Infect Dis 24, 28–34
106. MAID, D.G.; STOLZ, S.M.; WHEELER, S. (1997)
Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection by use of an antiseptic-impregnated catheter
Ann Intern Med 127, 257–266
107. MARSHALL, J.C.; CHRISTOU, N.V.; MEAKINS, J.L. (1988)
Immunomodulation by altered gastrointestinal tract flora. The effects of orally administered, killed *Staphylococcus epidermidis*, *Candida*, and *Pseudomonas* on systemic immune response
Arch Surg 123, 1465–1469
108. MAYSER, P.; HORT, W.; PFLIEGER-BRUSS, S. (2005)
Anogenitale Pilzkrankungen
Hautarzt 56, 531–539

109. MEDOFF, G.; COMFORT, M.; KOBAYASHI, G.S. (1971)
Synergistic action of Amphotericin B and 5-Fluorocytosine against yeast-like organisms
Proc Assoc Exp Biol Med 138, 571–574
110. METZGER, S.; HOFMANN, H. (1997)
Fluconazol resistente *Candida*-Arten von HIV-Patienten mit rezidivierender Candidastomatitis: In vitro-Empfindlichkeit gegenüber Itraconazol und Ketoconazol in HR- und RPMI 1640-Medium
Mycoses 40, 56–63
111. MIKAMI, Y.; SCALARONE, G.M.; KURITA, N.; YAZAWA, K.; UNO, J.; MIYAJI, M. (1992)
Synergistic postantifungal effect of Flucytosine and Fluconazole on *Candida albicans*
J Med Vet Mycol 30, 197–206
112. MITCHELL, K.G.; BRADLEY, J.A.; LEDINGHAM, I.M.; HAMILTON, D.N. (1982)
Candida colonization of the oral cavity
Surg Gynecol Obstet 154, 870–874
113. MOREIRA, M.E. (2005)
Controversies about the management of invasive fungal infections in very low birth weight infants
J Pediatr (Rio J) 81 (Supplement 1), 52–58
114. MÜLLER, J. (1994)
Die Epidemiologie tieflokalisierter, einheimischer Mykosen
Mycoses 37 (Supplement 2), 1–7
115. NASSOURA, Z.; IVATURY, R.R.; SIMON, R.J.; JABBOUR, N.; STAHL, W.M. (1993)
Candiduria as an early marker of disseminated infection in critically ill surgical patients: the role of Fluconazole therapy
J Trauma 35, 290–295

116. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (1997)
Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27–A
NCCLS, Wayne, PA
117. NGUYEN, M.H.; YU, V.L. (1995)
Meningitis caused by *Candida* species: an emerging problem in neurosurgical patients
Clin Infect Dis 21, 323–327
118. NGUYEN, M.H.; BARCHIESI, F.; McGOUGH, D.A.; YU, V.L.; RINALDI, M.G. (1995)
In vitro evaluation of combination of Fluconazole and Flucytosine against *Cryptococcus neoformans var. neoformans*
Antimicrob Agents Chemother 39, 1691–1695
119. NGUYEN, M.H.; PEACOCK, J.E.; MORRIS, A.J.; TANNER, D.C.; NGUYEN, M.L.; SNYDMAN, D.R.; WAGENER, M.M.; RINALDI, M.G.; YU, V.L. (1996)
The changing face of candidemia: Emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance
Am J Med 100, 617–623
120. NGUYEN, M.H.; NAJVAR, L.K.; YU, C.Y.; GRAYBILL, J.R. (1997)
Combination therapy with Fluconazole and Flucytosine in the murin model of *Cryptococcal* meningitis
Antimicrob Agents Chemother 41, 1120–1123
121. NINANE, J. (1994)
A multicentre study of Fluconazole versus oral Polyenes in the prevention of fungal infection in children with hematological or oncological malignancies. Multicentre study group
Eur J Clin Microbiol Inf Dis 13, 330–375

122. NOLA, I.; KOSTOVIC, K.; OREMOVIC, L.; SOLDI-BELIC, A.; LUGOVIC, L. (2003)
Candida infections today – how big is the problem?
Acta dermatovenerol Croat 11(3), 171–177
123. OHKAWA, M.; TOKUNAGA, S.; TAKASHIMA, M.; NISHIKAWA, T.; HISAZUMI, H.; FUJITA, S.; WHEAT, R.W. (1990)
In vitro susceptibility testing of *Candida* isolates from clinical specimens to four antifungal agents
Chemotherapy 36, 396–402
124. OLIVEIRA, E.R.; FOTHERGILL, A.W.; KIRKPATRICK, W.R.; COCO, B.J.; PATTERSON, T.F.; REDDING, S.W. (2005)
In vitro interaction of Posaconazole and Caspofungin against clinical isolates of *Candida glabrata*
Antimicrob Agents Chemother 49, 3544–3545
125. PANOS, R.J.; BARR, L.F.; WALSH, T.J.; SILVERMAN, H.J. (1988)
Factors associated with fatal hemoptysis in cancer patients
Chest 94, 1008–1013
126. PERFECT, J.R. (1996)
Fungal virulence genes as targets for antifungal chemotherapy
Antimicrob Agents Chemother 40, 1577–1583
127. PFALLER, M.A.; BURMEISTER, L.; BARTLETT, M.S.; RINALDI, M.G. (1988)
Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation
J Clin Microbiol 26, 1437–1441
128. PFALLER, M.A.; BARRY, A.L. (1994)
Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates
J Clin Microbiol 32, 1992–1996

129. PFALLER, M.A., BARRY, A.L. (1995)
In vitro susceptibilities of clinical yeast isolates to three antifungal agents determined by the microdilution method
Mycopathologica 130, 3–9
130. PFALLER, M.A. (1995)
Epidemiology of Candidiasis
J Hosp Infect 30 (Supplement), 329–338
131. PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. (2007)
Use of Fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to Voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida spp.* tested by clinical and laboratory standards institute–recommended broth microdilution methods
J Clin Microbiol 45, 70–75
132. PITTRROW, L.; PENK, A. (1996)
Plasma– und Gewebekonzentrationen von Fluconazol: Diskussion der Breakpointproblematik
Mycoses 39 (Suppl. 2), 58–65
133. PIZZO, P.A.; ROBICHAUD, K.J.; GILL, F.A. (1982)
Empiric antibiotics and antifungal therapy for cancer patients with prolonged fever and granulocytopenia
Am J Med 72, 101–111
134. PIZZO, P.A. (1992)
The compromised host
In: WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, L.H.; BENNETT, J.C. (eds.)
Cecil Textbook of Medicine, 19th ed., 1573–1584
Philadelphia, W.B. Saunder Company 1992
135. PODZORSKI, R.P.; HERRON, M.J.; FAST, D.J.; NELSON, R.D. (1989)
Pathogenesis of Candidiasis. Immunosuppression by cell wall mannan catabolites
Arch Surg 124, 1290–1294

136. POLAK, A. (1987)
 Combination therapy of experimental Candidiasis, Cryptococcosis,
 Aspergillosis and Wangiellosis in mice
 Chemotherapy 33, 381–395
137. POLAK, A. (1999)
 The past, present and future of antimycotic combination therapy
 Mycoses 42, 355 – 370
138. POLAK, A. (2001)
 Die antimykotische Therapie zu Beginn des dritten Jahrhunderts
 Editiones <ICN Pharmaceuticals>
139. POLAK–WYSS, A. (1989)
 Die antimykotische Chemotherapie opportunistischer
 Pilzinfektionen
 Basel, Editiones <Roche> 1989
140. POTEL, J.; ARNDT, K. (1982)
 Zur Frage der In–vitro–Testung von Hefen gegen antimykotische
 Substanzen
 Drug Res 32 (II), 1226–1233
141. PRUITT B.A.; McMANUS, A.T.; KIM, S.H.; GOODWIN, C.W. (1998)
 Burn wound infections: current status
 World J Surg 22, 135–145
142. RABINOVICI, R.; SZEWCZYK, D.; OVADIA, P.; GREENSPAN, J.H.;
 SIVALINGAM, J.J. (1997)
Candida pericarditis: clinical profile ad treatment
 Ann Thorac Surg 63, 1200–1204
143. RANDHAWA, H.S. (2000)
 Respiratory and systemic mycoses: an overview
 Indian J Chest Dis Allied Sci 42, 207–219
144. REX, J.H.; BENNETT, J.E.; SUGAR, A.M. (1994)
 A randomized trial comparing Fluconazole with Amphotericin B for
 the treatment of candidemia in patients without neutropenia
 N Engl J Med 331, 1325–1330

145. REX, J.H.; RINALDI, M.G.; PFALLER, M.A. (1995)
Resistance of *Candida* species to Fluconazole
Antimicrob Agents Chemother 39, 1–8
146. RIETH, H. (1979)
Mykosen und Antimykotika I
Pharmazie in unserer Zeit 8, 161–178
147. RÜCHEL, R. (1993)
Antigennachweis bei Mykosen: Methoden und Interpretationen
In: HEIZMANN, W.R. (Hrsg.): *Systemische Pilzinfektionen*, 119–127
Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
148. RODRIGUEZ–TUDELA, J.L.; MARTINEZ–SUAREZ, J.V. (1994)
Improved medium for Fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*
Antimicrob Agents Chemother 38, 45–48
149. RODRIGUEZ–TUDELA, J.L.; MARTINEZ–SUAREZ, J.V. (1995)
Defining conditions for microbroth antifungal susceptibility tests: influence of RPMI and RPMI – 2 % glucose on the selection endpoint criteria
J Antimicrob Chemother 35, 739–749
150. RUHNKE, M.; EIGLER, A.; TENNAGEN, I.; GEISELER, B.; ENGELMANN, E.; TRAUTMANN, M. (1994)
Emergence of fluconazole–resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal Candidosis and human immunodeficiency virus infection
J Clin Microbiol 32, 2092–2098
151. RUTLEDGE, R.; MANDEL, S.R.; WILD, R.E. (1986)
Candida species. Insignificant contaminant or pathogenic species
Am Surg 52, 299–302
152. SAAG, M.S.; DISMUKES, W.E. (1988)
Azole antifungal agents: Emphasis on new triazoles
Antimicrob Agents Chemother 32, 1–8

153. SAAG, M.S.; GRAYBILL, R.J.; LARSEN, R.A.; PAPPAS, P.G.; PERFECT, J.R.; POWDERLY, W.G.; SOBEL, J.D.; DISMUKES W.E. (2000)
Practice guidelines for the management of *Cryptococcal* disease.
Infectious diseases society of America
Clin Infect Dis 30, 710–718
154. SASAKI, E.; MAESAKI, S.; MIYAZAKI, Y.; YNAGIHARA, K.; TOMONO, K.; TASHIRO, K.; KOHNO, S. (2000)
Synergistic effect of Ofloxacin and Fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*
J Infect Chemother 6, 151–154
155. SCALARONE, G.M.; MIKAMI, Y.; KURITA, N.; YAZAWA, K.; UNO, J.; MIYAJI, M. (1991)
In vitro comparative evaluations of the postantifungal effect: synergistic interaction between Flucytosine and Fluconazole against *Candida albicans*
Mycoses 34, 405–410
156. SCHAEFER-KORTING, M. (1993)
Pharmacokinetic optimisation of oral antifungal therapy
Clin Pharmacokin 25, 329–341
157. SCHMALRECK, A.F. et al. (1996)
Empfindlichkeitsprüfung von Fluconazol: Auswertung einer Multicenter-Studie der Arbeitsgemeinschaft „Klinische Mykologie“ der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft
Mycoses 29 (Supplement 2), 1–11
158. SCHNEEMANN, H. (1992)
Liposomales Amphotericin B
Krankenhauspharmazie 13, 161–171

159. SEELIGER, H.P.R. (1988)
 Pilze – Pilzerkrankungen (Mykosen)
 In: BRANDIS, H; PULVERER, G. (Hrsg.)
 Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, 6. Auflage, 531–546
 Gustav Fischer Verlag Stuttgart/ New York
160. SEELIGER, H.P.R., SCHÜTT–GEROWITT, H. (1994)
 Mykologie
 In: BRANDIS, H.; KÖHLER, W.; EGGERS, H.J.; PULVERER, G.
 (Hrsg.)
 Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, 7. Auflage, 621–630
 Gustav Fischer Verlag Stuttgart/ Jena/ New York
161. SEIBOLD, M.; WERNER, E. (1995)
 Testing susceptibility of *Candida* species to Fluconazole and Itraconazole using the microdilution assay
 Mycoses 38, 443–448
162. SILLING, G.; FEGELER, W.; ROOS, N.; ESSINK, M.; BUCHNER, T. (1999)
 Early empiric antifungal therapy of infections in neutropenic patients comparing Fluconazole with Amphotericin B/Flucytosine
 Mycoses 42 (Supplement 2), 101–104
163. SMEGO, R.A.; PERFECT, J.R.; DURACK, D.T. (1984)
 Combined therapy with Amphotericin B and 5–Fluorocytosine for *Candida* meningitis
 Rev Infect Dis 6, 791–801
164. SOBEL, J.D.; KAUFFMAN, C.A.; MCKINSEY, D.; ZERVOS, M.; VAZQUEZ, J.A.; KARCHMER, A.W.; LEE, J.; THOMAS, C.; PAUZER, H.; DISMUKES, W.E. (2000)
 Candiduria: a randomized, double–blind study of treatment with Fluconazole and placebo
 Clin Infect Dis 30, 19–24

165. SOBEL, J.D. (2002)
Vulvovaginal Candidiasis: a comparison of HIV-positive and -
negative women
Int J STD AIDS 13, 358–362
166. SOLOMKIN, J.S.; FLOHR, A.B.; QUIE, P.G. (1980)
The role of *Candida* in intraperitoneal infections
Surgery 88, 524–530
167. SOLOMKIN, J.S.; FLOHR, A.B.; SIMMONS, R.L. (1982)
Candida infections in surgical patients. Dose requirements and
toxicity of Amphotericin B
Ann Surg 195, 177–185
168. SPEBAR, M.J.; WALTERS, M.J.; PRUITT, B.A. (1981)
Candidiasis in the burned patient
J Trauma 21, 237–239
169. STEER, P.L.; MARKS, M.I.; KLITE, P.D.; EICKHOFF, T.C. (1972)
5-Fluorocytosine: An oral antifungal compound
Ann Int Med 76, 15–22
170. ST-GERMAIN, G.; LAVERDIERE, M.; PELLETIER, R. (1999)
Candida species isolated from normally sterile sites: variations in
species and antifungal susceptibility pattern for an 2-year
surveillance program in Quebec
Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol, abstract no. F-110
171. STILLER, R.L.; BENNETT, J.E.; SCHOLER, H.J.; WALL, M.; POLAK, A.;
STEVENS, D.A. (1982)
Susceptibility to 5-Fluorocytosine and prevalence of serotype in
402 *Candida albicans* isolates from the United States
Antimicrob Agents Chemother 22, 482–487

172. TAKAKURA, S.; FUJIHARA, N.; SAITO, T.; KUDO, T.; IINUMA, Y.; ICHIYAMA, S.; JAPAN INVASIVE MYCOSIS SURVEILLANCE STUDY GROUP (2004)
National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including Voriconazole and Micafungin
J Antimicrob Chemother 53, 283–289
173. TAKAKURA, S.; FUJIHARA, N.; SAITO, T.; KUDO, T.; IINUMA, Y.; ICHIYAMA, S.; JAPAN INVASIVE MYCOSIS SURVEILLANCE STUDY GROUP (2004)
Clinical factors associated with Fluconazole resistance and short-term survival in patients with *Candida* bloodstream infection
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 23, 380–388
174. TE DORSTHORST, D.T.; VERWEIJ, P.E.; MELETIADIS, J.; BERGERVOET, M.; PUNT, N.C.; MEIS, J.F.; MOUTON, J.W. (2002)
In vitro interaction of Flucytosine combined with Amphotericin B or Fluconazole against thirty–five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach
Antimicrob Agents Chemother 46, 2982–2989
175. TERRELL, C.L. (1999)
Antifungal agents. Part II. The azoles
Mayo Clin Proc 74, 78–100
176. THALER, M.; PASTAKIA, B.; SHAWKER, T.H.; O'LEARY, T.; PIZZO, P.A. (1988)
Hepatic candidiasis in cancer patients: the evolving picture of the syndrome
Ann Intern Med 108, 88–100
177. VAN DEN BOSSCHE, H.; MARICHAL, P.; ODDS, F.C.; LE JEUNE, L.; COENE, M.C. (1992)
Characterization of an azole–resistant *Candida galbrata* isolates
Antimicrob Agents Chemother 36, 2602–2610

178. WALSH, T.J.; HUTCHINS, G.M.; BULKLEY, B.H. (1980)
Fungal infections of the heart: an analysis of 51 autopsied patients
Am J Cardiol 45, 357–366
179. WALSH, T.J.; PIZZO, A. (1988)
Treatment of systemic fungal infections: Recent progress and
current problems
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 7, 460–475
180. WALSH, T.J.; LEE, J.; LECCIONES, J. (1991)
Empiric therapy with Amphotericin B in febrile granulocytopenic
patients
Rev Infect Dis 13, 496–503
181. WALSH, T.J.; VAN CUTSEM, J.; POLAK, A.; GRAYBILL, J.R. (1992)
Immunomodulation and antifungal therapy of experimental
invasive candidosis, histoplasmosis and aspergillosis: recent
advances and concepts
J Med Veter Mycol 30 (Supplement 1), 225–240
182. WEBER, S.; POLAK-WYSS, A. (1991)
Das Resistenzverhalten von Sproßpilzisolaten aus definierten
Probandengruppen gegenüber 5-Fluorcytosin
Mycoses 34 (Supplement), 77–81
183. WEDDING, U.; GEISS, H.K.; THEILMANN, L.; STREMMEL, W. (1995)
Candida-Besiedlung und Befall des Gastrointestinaltraktes
Deutsches Ärzteblatt 92, C-2179–2184
184. WEGMANN, T. (1994)
Medizinische Mykologie – ein praktischer Leitfaden
Basel, Editiones Roche
185. WENZEL, R.P. (1995)
Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality
Clin Infect Dis 20, 1531–1534

186. WEY, S.B.; MORI, M.; PFALLER, M.A.; WOOLSON, R.F.; WENZEL, R.P.(1988)
Hospital–Acquired Candidemia – The attributable mortality and excess length of stay
Arch Int Med 148, 2642–2645
187. WEY, S.B.; MORI, M; PFALLER, M.A. (1989)
Risk factors for hospital–acquired Candidemia: a matched case–control study
Arch Intern Med 149, 2349–2353
188. WILDFEUER, A.; LAUFEN, H.; SCHMALRECK, A.F.; YEATES, R.A.; ZIMMERMANN, T. (1996)
Fluconazol: Vergleich von Pharmakokinetik, Therapie und Empfindlichkeit der Sprosspilze in vitro
Mycoses 39 (Supplement 2), 51–57
189. WINGARD, J.R.; MERZ, W.G.; RINALDI, M.G.; JOHNSON, T.R.; KARP, J.E.; SARAL, R. (1991)
Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with Fluconazole
N Engl J Med 325, 1274–1277
190. WILSON, C. (2005)
Recurrent vulvovaginitis candidiasis; an overview of traditional and alternative therapies
Adv Nurse Pract 13, 24–29
191. WISE, G.J.; SILVER, D.A. (1993)
Fungal infections of the genitourinary system
J Urol 149, 1377–1388
192. WRIGHT, W.L., WENZEL, R.P. (1997)
Nosocomial *Candida*. Epidemiology, transmission, and prevention
Infect Dis Clin North Am 11, 411–425

193. YAMAMOTO, Y.; MAESAKI, S.; KAKEYA, H.; YANAGIHARA, K.; OHNO, H.; OGAWA, K.; HIRAKATA, Y.; TOMONO, K.; KOGA, H.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. (1997)
Combination therapy with Fluconazole and Flucytosine for pulmonary Cryptococcosis
Chemotherapy 43, 436–441
194. YONGA, G. (1995)
Current drug therapy of systemic mycoses: a review
East Afr Med J 72, 394–398
195. YOON, S.A.; VAZQUEZ, J.A.; STEFFAN, P.E.; SOBEL, J.D.; AKINS, R.A. (1999)
High–frequency in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from Amphotericin B susceptibility to resistance
Antimicrob Agents Chemother 43, 36–45
196. ZINGMAN, B.S. (1996)
Treatment of mucosal Candidiasis in HIV–infected patients
J Mycol Med 6 (Supplement 2), 3–11

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. G. Peters, dem Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster, danke ich für die Möglichkeit in seinem Institut zu arbeiten.

Bei Herrn Prof. Dr. med. W. Fegeler bedanke ich mich sehr herzlich für das Überlassen des Themas und die umfassende und freundliche Betreuung während der Durchführung der Arbeit.

Den medizinisch–technischen Assistentinnen der mykologischen Abteilung am Institut für Medizinische Mikrobiologie der WWU Münster sei Dank gesagt für die zahlreichen wertvollen Ratschläge und für die Hilfe bei der Einarbeitung in die diagnostischen Verfahren.

Den Mitarbeitern der Nährbodenküche des Institutes für Medizinische Mikrobiologie möchte ich meinen Dank für die Bereitstellung der Kulturmedien aussprechen.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder Thomas für die Unterstützung während der Arbeit an dieser Dissertation und meines Studiums.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten	Name:	Gemmeke
	Vorname:	Astrid
	Geburtstag:	18.01.1977
	Geburtsort:	Warburg
	Familienstand:	Ledig
	Nationalität:	Deutsch
	Eltern:	Wolfgang Gemmeke, Renate Gemmeke
Schulbildung	01.08.1983– 31.07.1987	Grundschule Scherfede in Warburg
	01.08.1987– 31.07.1996	Gymnasium Marianum in Warburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,3
Hochschulbildung	01.10.1996– 27.11.2002	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms–Universität Münster Abschluss: Staatsexamen, Gesamtnote: gut
Berufserfahrung	01.02.2003– 31.07.2004	Ärztin im Praktikum, Klinik für Dermatologie und Allergologie, Krankenhaus Dresden–Friedrichstadt
	01.08.2004	Vollapprobation als Ärztin
	01.08.2004– 27.02.2007	Assistenzärztin, Klinik für Dermatologie und Allergologie, Krankenhaus Dresden– Friedrichstadt
	27.02.2007	Prüfung zur Fachärztin für Dermatologie und Venerologie
	seit 28.02.2007	Fachärztin, Klinik für Dermatologie und Allergologie, Krankenhaus Dresden– Friedrichstadt

Warburg, 10.03. 2008

Astrid Gemmeke