

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

**EINFLUSSNAHME METHODOLOGISCHER FAKTOREN AUF DAS
ERGEBNIS DER EMPFINDLICHKEITSTESTUNG VON HEFEN AUS DEM
MUNDRAUM GEGENÜBER AMPHOTERICIN B UND FLUCONAZOL**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Stefanie Schmitz-Huebner
aus Münster

2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Fegeler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. W. Mathys

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2011

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

ZUSAMMENFASSUNG

Einflussnahme methodologischer Faktoren auf das Ergebnis der Empfindlichkeits-- testung von Hefen aus dem Mundraum gegenüber Amphotericin B und Fluconazol.

Stefanie Schmitz-Huebner

Das Antimykotikum Amphotericin B (APH) in seiner lokal topischen Form ist das am häufigsten eingesetzte Antimykotikum zur Behandlung oraler Mykosen. Eine Alternative dazu stellt das Azolantimykotikum Fluconazol (FCA) dar. Der Mikrodilutionstest (MDT) nach DIN 58940-84 und der einfacher durchzuführende „E-Test“ stellen in der Routine viel verwendete Testmethoden zur Empfindlichkeitsbestimmung von Hefen dar, wobei sie teils unterschiedliche Ergebnisse aufweisen.

An 144 klinischen Hefe-Isolaten wurde daher die Einflussnahme beider Testverfahren auf die Empfindlichkeitsverteilung der Hefen auf bzw. in Yeast Susceptibility Testmedium (YST) untersucht. Die hier aufgeführten Ergebnisse entstammen der Analyse der minimalen Hemmkonzentrations(MHK)-Werte nach 48 Stunden.

Gegenüber Amphotericin B zeigten sich deutlich größere Differenzen zwischen den MHK-Ergebnissen der beiden Testmethoden als gegenüber Fluconazol: So war gegenüber APH knapp ein Drittel (32,6%) der MHK-Werte im E-Test signifikant niedriger als im MDT, gegenüber FCA machte dieser Anteil nur 11,1% aus. Eine Übereinstimmung der MHK-Ergebnisse beider Testsysteme fand sich im Bereich von ± 2 Konzentrationsstufen bei APH mit 66,7% (n=96) und bei FLC mit 88,2% (n=127).

In einem zweiten Schritt ermöglichte die Paralleltestung mit dem gleichen Inokulum an einem Teilkollektiv von 58 Hefe-Isolaten die Einflussnahme des Nährmediums, (RPMI1640 vs. YST), des Puffersystems (Phosphatpuffer nach Sørensen vs. MOPS) sowie die Zugabe von Methyleneblau (0,5mg/l) modellhaft zu analysieren. Die jeweiligen Testmedienpaare basierten auf RPMI1640 und waren mit Ausnahme der zu untersuchenden Faktoren identisch. Alle Medien waren auf 2%-Glucose-Endkonzentration eingestellt.

Gemeinsam war beiden Antimykotika die Reihenfolge des Ausmaßes der Beeinflussung: Nährmedium > Puffer > Methyleneblau-Zugabe. Die untersuchten Faktoren führten für Amphotericin B und Fluconazol teilweise zu konträren Einflüssen: So senkte z.B. der Einsatz von Phosphatpuffer den resistenten Anteil gegenüber Amphotericin B, erhöhte aber den resistenten Anteil gegenüber Fluconazol.

Den größten Einfluss auf die Empfindlichkeitsverteilung der beiden Antimykotika hatte jedoch die Methode der Empfindlichkeitstestung.

Ein Vergleich von Ergebnissen der antimykotischen Empfindlichkeitsbestimmung gegenüber Amphotericin B oder Fluconazol sollte daher nur dann erfolgen, wenn die Methode und das Testmedium gleich sind.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2011

Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel

**EINFLUSSNAHME METHODOLOGISCHER FAKTOREN AUF DAS ERGEBNIS DER
EMPFINDLICHKEITSTESTUNG VON HEFEN AUS DEM MUNDRAUM GEGENÜBER
AMPHOTERICIN B UND FLUCONAZOL**

in der

Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
des Universitätsklinikums Münster

unter Anleitung von

Prof. Dr. med. W. Fegeler

selbstständig angefertigt,

nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen
Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes
oder ungedrucktes Material verwendet,

keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,

sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung
einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation,
Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung
eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den 27.05.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Erkrankungen durch Hefen in der Mundhöhle.....	1
1.2	Krankheitsbilder der oralen Candidose.....	3
1.3	Antimykotika-Therapie bei oropharyngealer Candidose.....	5
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Klinische Isolate.....	10
2.1.1	Testphase I.....	10
2.1.2	Testphase II.....	11
2.2	Qualitäts-Kontrollstämme.....	12
2.3	Nährmedien im Überblick.....	13
2.4	Vorbereitende Maßnahmen.....	14
2.5	Erstellen des Inoculums.....	14
2.6	E-Test.....	15
2.6.1	Anlage.....	15
2.6.2	Antimykotika.....	16
2.6.3	Nährmedien in den verschiedenen Testphasen.....	16
2.6.4	Ablesung der E-Teste.....	18
2.7	Mikrodilutionstest.....	18
2.7.1	Anlage und Antimykotika.....	18
2.7.2	Nährmedien im Mikrodilutionstest.....	19
2.7.3	Ablesung der Mikrodilutionstests.....	20
2.7.4	Kontrolle des Inokulums.....	20
2.8	Auswertung.....	21
2.8.1	Allgemeine Anmerkungen.....	21
2.8.2	Deskriptive Auswertungen.....	21
2.8.3	Vergleichende Auswertungen auf der Basis der S-I-R-Klassifikation.....	22
3	Ergebnisse der eigenen Untersuchungen.....	24
3.1	Einfluss der Testmethoden (Mikrodilutions- und E-Test) auf die Empfindlichkeitsverteilung	24

3.1.1 Einfluss der Testmethoden bei klinischen Isolaten.....	24
3.1.1.1 auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Amphotericin B	24
3.1.1.2 auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Fluconazol.....	28
3.1.1.3 auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Amphotericin B im Vergleich zu Fluconazol.....	31
3.1.2 Einfluss der Testmethoden bei Kontrollstämmen.....	32
3.1.2.1 auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Amphotericin B.....	32
3.1.2.2 auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Fluconazol.....	32
3.1.2.3 auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Voriconazol.....	33
3.1.2.4 auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Flucytosin.....	34
3.1.2.5 auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Itraconazol.....	35
3.2 Einfluss der Nährmedien auf die Empfindlichkeitsverteilung von klinischen Isolaten	36
3.2.1 unter Verwendung des Yeast-Susceptibility-Testmediums (YST) im Vergleich zum Antibiotika-Medium 3 (AM3).....	36
3.2.1.1 im E-Test gegenüber Amphotericin B.....	36
3.2.2 unter Verwendung der Nährmedien YST, RPMI-E, RPMI-S und RPMI-MB.....	43
3.2.2.1 gegenüber Amphotericin B im E-Test.....	43
3.2.2.2 gegenüber Amphotericin B und Fluconazol im Mikrodilutionstest	46
3.2.3 Einfluss der Nährmedien: Faktorenanalyse im Mikro- dilutionstest gegenüber Amphotericin B und Fluconazol.....	50
3.2.3.1 Einfluss des Basisnährbodens (RPMI-S vs. YST).....	50
3.2.3.2 Einfluss des Puffersystems (RPMI-S vs. RPMI-MB)...	54

3.2.3.3	Einfluss von Methylenblau (RPMI-E vs.RPMI-MB).....	57
3.2.4	Vergleich der Ergebnisse des Mikrodilutionstests mit denen des E-Testes für die Nährmedien YST und RPMI-E bei Verwendung von Amphotericin B.....	60
3.3	Untersuchungen zum Einfluss der Nährmedien an den Kontrollstämmen.....	62
4	Diskussion.....	63
4.1	Art-Verteilung der Hefe-Isolate.....	63
4.2	Empfindlichkeitsverteilung gegenüber Amphotericin B und Fluconazol.....	65
4.3	Einflussnahme der Testmethode.....	66
4.4	Einflussnahme des Nährmediums.....	71
4.4.1	Einfluss des Basismediums.....	72
4.4.2	Einflussnahme durch das Puffersystem.....	74
4.4.3	Einflussnahme durch Methylenblau.....	77
5	Zusammenfassung.....	79
6	Tabellen-Anhang.....	83
7	Literaturverzeichnis.....	99
8	Danksagung.....	109
9	Lebenslauf.....	110

1. Einleitung

1.1 Erkrankungen durch Hefen in der Mundhöhle

Orale Candidosen, im anglo-amerikanischen Sprachraum auch als orale Candidiasis bezeichnet, sind die häufigsten Mykosen im Mundraum. Der Nachweis von Hefen der Gattung *Candida* bedeutet jedoch nicht gleichzeitig das Vorliegen einer Mykose, da *Candida*-Hefen als opportunistische Krankheitserreger für die Ausprägung einer Mykose prädisponierender Faktoren bedürfen.

Auch in der Mundhöhle gesunder Probanden sind häufig Hefen der Gattung *Candida* als transiente Flora vorhanden: So lag in einer Metaanalyse die Nachweishäufigkeit von *Candida*-Hefen im Mundraum gesunder Personen zwischen 2% und 71,3%, wobei der gewichtete Mittelwert 25,5 % betrug (ODDS 1988).

Prädisponierende Faktoren, die die Entstehung einer oropharyngealen Candidose begünstigen, können erkrankungs- und / oder therapiebedingt sein. Bei den erkrankungsbedingten Formen kann zwischen lokalen (z.B. Irritationen durch Zahn-Prothesen, Xerostomie) und systemischen Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, HIV, Eisen-Mangel) unterschieden werden.

Eine therapiebedingte Prädisposition für eine orale Candidose kann unter anderem durch Einnahme von Zytostatika, Corticosteroiden oder Breitspektrum-Antibiotika vorliegen (Tab. A 01).

Nicht selten führt, neben der Grunderkrankung selbst, auch die gegen die Grunderkrankung gerichtete Therapie zu einer mehrfachen Prädisposition (z.B. Leukämie, Knochenmarks-Transplantation mit ihren Therapien und der anschließenden Immunsuppression).

Tab. A 01: Prädisponierende Faktoren für die Entstehung einer oralen Candidose (Auswahl). Übersicht nach AKPAN et al. 2002, HORGAN et al. 2003, RENNIE et al. 1984, AXELL et al. 1997

Prädispositionen für Mykosen des Mundraumes			
erkrankungsbedingt		therapiebedingt	anderer Art
lokal	systemisch		
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Irritationen durch Zahnprothesen ▪ Xerostomie bei Sjögren-Syndrom ▪ orale Malignome ▪ Leukoplakie ▪ Lichen planus ▪ Lupus erythematodes 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Eisen-Mangel ▪ Diabetes mellitus ▪ Cushing-Syndrom ▪ Immunsuppression (z.B. durch HIV) ▪ Leukämie ▪ Vitamin B-Mangel ▪ Thymus-Aplasie ▪ Candida-Endokrinopathie-Syndrom ▪ Tumor-Erkrankungen ▪ Knochenmarks-/Organ-Transplantationen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Strahlentherapie (z.B.: Xerostomie) ▪ trizyklische Antidepressiva ▪ Immunsuppressiva ▪ Zytostatika ▪ Breitspektrum-Antibiotika ▪ Corticosteroide 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Rauchen ▪ schlechte Mundhygiene

In einer aktuellen Studie wurden bei 14,3% der gesunden Kontrollpersonen Hefen der Gattung *Candida* aus Mundspülwasser nachgewiesen. Mit 33,3% war der Hefe-Nachweis bei Patienten mit einem Diabetes mellitus signifikant höher als bei den Kontrollpersonen. Während bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1 in 51,2% ein *Candida*-Nachweis vorlag, war dies bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 nur in 25% der Fall (AL-ATTAS et al. 2010). Dies zeigt, dass es bei einer prädisponierenden Grunderkrankung auch Unterschiede in der Ausprägung des Prädispositionsgrades geben kann.

Die *Candida*-Kolonisation der Mucosa stellt einen Risikofaktor zur Entstehung einer invasiven Candidose dar (RÜPING et al. 2008). Patienten mit hämatologischen Erkrankungen entwickeln unter immunsuppressiver Therapie in 15%-60% eine orale Candidose (NINANE 1994).

Bei herabgesetzter Immunabwehr (z.B. bei aplasiogener Therapie im Rahmen einer Leukämietherapie) können die Hefen vom Mundraum aus über den Gastrointestinaltrakt in die Blutbahn gelangen und im Rahmen einer Septikämie zu schwerwiegenden systemischen Infektionen führen (KRAUSE et al. 1969, VOLKHEIMER 1972, FEGELER 1982, NUCCI et al. 2001, AKPAN et al. 2002). Die Sterblichkeitsrate von invasiven Candidosen liegt seit 1997 im Durchschnitt bei 0,4 Todesfällen pro 100.000 Personen im Jahr (Pfaller et al. 2007). Betrachtet man hingegen die Letalität bei einer Candidämie, die zwischen 30% und 50% liegt, so werden die reale Bedeutung dieser sekundären Komplikation und die Bedeutung der Hefen im Mundraum prädisponierter Patienten sichtbar (FRASER et al. 1992, WENZEL 1995, BLOT et al. 2002, PAPPAS et al. 2003, SAFDAR et al. 2004., LEROY et al. 2009).

1.2 Krankheitsbilder der oralen Candidose

Orale *Candida*-Infektionen können Ursache verschiedener Krankheitsbilder sein (Tab. A 02).

Tab. A 02: Klassifikation der oralen Candidiasis nach klinischen Krankheitsbildern in Anlehnung an AXÉLL et al. (1997) und FARAH et al (2010)

Akute Formen	Chronische Formen
<ul style="list-style-type: none"> ▪ pseudomembranös ▪ erythematös 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pseudomembranös ▪ erythematös (z.B. Prothesenstomatitis) ▪ hyperplastisch <ul style="list-style-type: none"> - nodulär - plaque-förmig ▪ Cheilitis angularis ▪ Glossitis rhombica mediana

Bei der pseudomembranösen Candidose treten auf der Mundschleimhaut weißlich cremige Beläge auf. Bei Entfernung der Schicht erscheint die darunter liegende Mucosa rot und erythematös und fängt leicht an zu bluten. Die weißlichen Beläge bestehen aus nekrotischem Gewebe, abgeschilferten Epithelzellen, Fibrin und Pilzen in ihren verschiedenen Wachstumsformen. Die pseudomembranöse Candidiasis ist die häufigste Erscheinungsform bei immunsupprimierten Patienten, sie verläuft meistens symptomlos. (REICHERT 2003, MCCULLOUGH et al. 2005, SCULLY et al. 1994, FARAH et al. 2010)

Die erythematöse Form der Candidose ist gekennzeichnet durch rote erythematöse Bereiche auf der Gaumenschleimhaut oder atrophische apapilläre Regionen am Zungenrücken. An der Wangenmucosa ist sie seltener lokalisiert. Die erythematöse Candidose tritt häufig bei Prothesenträgern auf. Sie kann sowohl asymptomatisch als auch symptomatisch (z.B. brennender Schmerz) verlaufen. (REICHERT 2003, SCULLY et al. 1994, MCCULLOUGH et al. 2005, WEBB et al. 1998)

Die chronisch hyperplastische Candidose ist gekennzeichnet durch scharf begrenzte, leicht erhabene und nicht abwischbare Beläge vorwiegend im Bereich der Wangenschleimhaut in Form einer Leukoplakie. Bei starkem Tabakkonsum, der insbesondere eine Prädisposition für diese Form der Candidiasis darstellt, können die ansonsten weißlich-transluzenten Beläge eine bräunliche Farbe annehmen. Die hyperplastische Candidose kann in zwei verschiedenen Erscheinungsformen auftreten: als ein isolierter großflächiger Plaque (Plaque-Form) oder als viele kleine weißliche Knötchen auf erythematösem Grund (noduläre Form) (HORGAN et al. 2003, SCULLY et al. 1994, WEBB et al. 1998, FARAH et al. 2010).

Die Cheilitis angularis ist eine chronisch entzündliche Läsion der Mundwinkel, die häufig von *Candida albicans* verursacht oder unterhalten wird. In der Regel ist sie assoziiert mit einer intraoralen Candida-Infektion. Sie verläuft meist symptomatisch und bilateral. Besonders häufig tritt sie bei Patienten auf, die

Prothesen mit einer zu geringen vertikalen Höhe tragen (HORGAN et al. 2003, MCCULLOUGH et al. 2005, FARAH et al. 2010).

Die Glossitis rhombica mediana ist eine in der Regel symmetrisch auftretende Läsion des Zungenrückens, die unmittelbar vor den Papillae vallatae gelegen ist. Die Region ist gekennzeichnet durch eine Atrophie der fungiformen und filliformen Papillen (HORGAN et al. 2003, MCCULLOUGH et al. 2005, FARAH et al. 2010).

Oft sind die Hefen nicht die primäre Ursache der entsprechenden Erkrankungsbilder, nicht selten aber verhindern sie bei richtigem Therapieansatz die Abheilung. So sind bei allen oralen Candidosen differentialdiagnostische Überlegungen, sowie die Frage nach prädisponierenden Faktoren, lokal und / oder systemisch, notwendig. Eine Behebung oder zumindest eine eindeutige Verminderung der prädisponierenden Faktoren gehört zu jeder antimykotischen Therapie und ist eine der Voraussetzungen für einen nachhaltigen Therapieerfolg.

1.3 Antimykotika-Therapie bei oropharyngealer Candidose

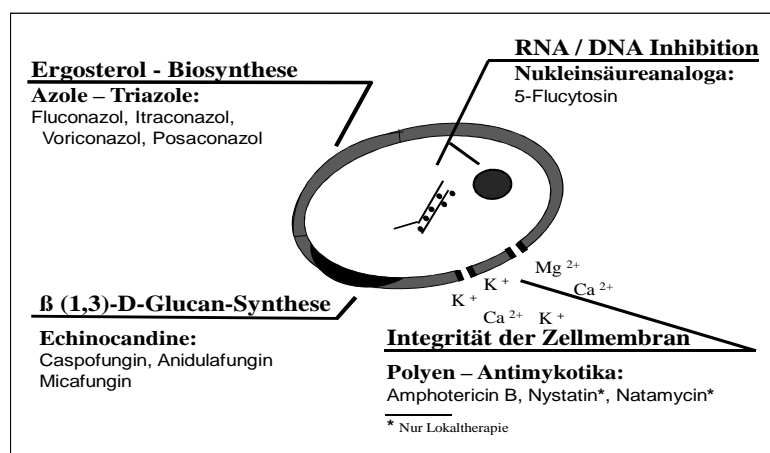
Die derzeit in Deutschland für die systemische Therapie zugelassenen Antimykotika lassen sich nach ihrer chemischen Struktur vier Wirkstoffgruppen zuordnen: den Polyen-Antimykotika, den Nukleinsäureanaloga, den Azolen und den Echinocandinen. Die Angriffspunkte und Wirkungsmechanismen variieren für die einzelnen Wirkstoffgruppen und ihre Antimykotika (Abb. A 01).

Polyene bilden Komplexe mit dem Ergosterin der Pilzzellmembran. Dadurch entstehen Poren in der Zellwand, wodurch eine Permeabilitätsänderung und schließlich die Zerstörung der Pilzzellmembran hervorgerufen werden (HOF et al. 2005).

Das Nucleinsäureanalogon 5-Flucytosin wird in der Pilzzelle in 5-Fluoruracil umgewandelt und agiert dann als Antimetabolit des Cytosins. Dies führt zu einer Störung der DNA- und Proteinsynthese (HAHN et al. 2004).

Azole bewirken eine Hemmung der 14 α -Dimethylase, einem Zytochrom-P450-Isoenzym, welches die Synthese von Ergosterin katalysiert. Dadurch wird zunächst das Wachstum der Zelle unterbunden. Durch Ansammlung toxischer Vorstufen des Ergosterins erfolgt eine irreversible Schädigung der Pilzzelle, bis diese schließlich abstirbt (HOF et al. 2005).

Echinocandine sind Lipopeptide. Sie inhibieren die Synthese von β -1-3-Glucan, welches ein essentieller Bestandteil der Pilzzellwand ist. Darüber hinaus werden auch andere Bausteine der Zellwand beeinflusst, so wird der Gehalt an Chitin erhöht und der Einbau von Ergosterin verringert, sodass die Membranstruktur der Pilzzelle maßgeblich verändert wird (HOF 2003).



Modifiziert nach Fegeler (2008) Hand out zur Vorlesung f: Medizinische Mikrobiologie für Zahnmediziner

Abb. A 01: Angriffspunkte der Antimykotika der systemischen Therapie nach Wirkstoffgruppen geordnet.

Die am häufigsten zur Therapie oropharyngealer Candidosen eingesetzten Antimykotika sind Amphotericin B in seinen lokalen Applikationsformen und Fluconazol.

Amphotericin B wird durch seine hydrophoben Eigenschaften schlecht, bzw. gar nicht resorbiert, wodurch die Wirkung bei oraler Gabe auf den Verdauungstrakt beschränkt bleibt (AKPAN et al. 2002). Die Darreichungsform der Wahl stellen dabei Lutschtabletten, Salben oder Suspensionen dar, wobei insbesondere auf eine lange orale Verweildauer zu achten ist. Zur Behandlung einer unkomplizierten oralen Candidose wird z.B. empfohlen, 4 x täglich 2 Wochen lang mit 1ml Suspension (100mg/ml) nach dem Essen eine Mundspülung vorzunehmen (ELLEPOLA et al 2000).

Nebenwirkungen, wie sie bei der intravenösen Gabe von Amphotericin B als kolloidale Suspension mit Desoxychololat auftreten, gibt es bei der lokalen Therapie nicht.

Die intravenöse Applikationsform von Amphotericin B-Desoxychololat ist heute auf Grund der häufigen und teilweise schweren Nebenwirkungen, insbesondere im Bereich der Nieren (HOF et al. 2005, HOF 2003), in der Therapie invasiver Mykosen durch liposomale Applikationsformen abgelöst worden. Die drei liposomalen Amphotericin B-Präparationen haben deutlich geringere Nebenwirkungen, unterscheiden sich jedoch in ihrer Pharmakokinetik und Pharmakodynamik (GROLL et al. 2004).

Resistenzen gegenüber Amphotericin B sind selten. Patienten, die zuvor mit Polyenen, Azol-Antimykotika oder Zytostatika behandelt wurden, scheinen jedoch ein erhöhtes Risiko zu haben, dass sich bei der (erneuten) Therapie mit Amphotericin B eine Resistenz gegen das Antimykotikum entwickelt (WHITE et al. 1998).

Neben der Behandlung von primärer oropharyngealer Candidose wird Amphotericin B lokal auch bei der oralen Manifestationen systemischer Candidosen in Kombination mit einer systemischen Therapie verabreicht (ELLEPOLA et al. 2000).

Fluconazol ist das bisher einzige hydrophile Azol und kann sowohl oral als auch parenteral gegeben werden. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über die Niere. Wie alle Triazole ist es in der Regel recht gut verträglich. Grundsätzlich kann es jedoch zu Wechselwirkungen mit Medikamenten kommen, die wie es selbst in der Leber über das Zytochrom-P450-System abgebaut werden (z.B. Antiepileptika) (HOF et al. 2005).

Es wird zur Therapie oberflächlicher und systemischer *Candida*-Infektionen eingesetzt und wegen seiner guten Verträglichkeit und Wirksamkeit auch zur Prophylaxe bei immunsupprimierten Patienten, wobei allerdings auf sein Wirkspektrum (insbesondere kein Einschluss von Schimmelpilzen) und auf eine sekundäre Resistenzentwicklung geachtet werden muss (HAHN et al. 2004).

Während Fluconazol gegenüber den meisten *C. albicans*-Stämmen wirksam ist, weisen manche anderen *Candida*-Arten eine verminderte Empfindlichkeit auf. *C. krusei* besitzt sogar eine intrinsische Resistenz gegenüber dem Antimykotikum (SARAMANAYAKE et al. 1994).

Fluconazol wird als Saft, in Tabletten-Form oder intravenös verabreicht. Die Therapie gegen oropharyngeale Candidiasis sieht eine Tagesdosis von 200mg am 1. Tag und jeweils 100mg an den Folgetagen vor. Die Behandlungsdauer beträgt in der Regel 14 bis 21 Tage (ZONIOS et al. 2008).

Das Medikament der Wahl ist Fluconazol bei der Behandlung von oropharyngealen Candidosen von HIV-Patienten (ELLEPOLA et al. 2000). Eine Konsequenz der verbreiteten antimykotischen Therapie in dieser Patientengruppe ist die Zunahme von Isolaten mit verminderter Empfindlichkeit. Insbesondere bei Patienten mit fortgeschrittener HIV-Infektion (CD4 und Lymphozyten-Zahlen $<50/\text{mm}^3$), die u.a. mit einer lang andauernden Fluconazol-Therapie behandelt werden, kommen vermehrt resistente Isolate vor (HORGAN et al 2003).

Insgesamt zeichnet sich jedoch kein einheitliches Bild bezüglich des Anteils an Hefe-Isolaten mit einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol ab. So wiesen orale Hefe-Isolate von Diabetes mellitus – Patienten vermehrt eine Resistenz gegenüber Fluconazol auf: In einer Studie mit 150 an Diabetes mellitus (DM) erkrankten und 50 gesunden Kontrollpersonen zeigten 28,6% der Isolate von DM-Patienten (Typ I: 26,3%, Typ II: 31,3%) in vitro eine Resistenz gegenüber Fluconazol. Die Isolate der gesunden Testpersonen verhielten sich zu 100% sensibel gegenüber dem Antimykotikum. Die Empfindlichkeitstestung fand jeweils mittels einer Zucker-Schnelltest-Platte („Candifast kit“) statt, die Kavitäten mit verschiedenen Antimykotika enthielt. Als Nährmedium wurde Sabouraud`s Dextrose-Agar verwendet. In der Testung gegenüber Amphotericin B verhielten sich sowohl die Isolate von Patienten mit Diabetes mellitus als auch die der gesunden Versuchspersonen gleichermaßen sensibel (AL-ATTAS et al. 2010).

In einer anderen Studie, in der die Empfindlichkeit von oralen *Candida*-Isolaten mittels des Fungitests (im Nährmedium RPMI₁₆₄₀) untersucht wurden, lagen hingegen zwischen den Isolaten von Patienten mit Diabetes mellitus und denen der gesunden Kontrollpersonen hinsichtlich des Resistenzverhaltens gegenüber Fluconazol und Amphotericin B keine signifikanten Unterschiede vor (MANFREDI et al. 2006).

Da jedoch für Fluconazol auch eine Abhängigkeit der In vitro - Empfindlichkeit von Hefen der Gattung *Candida* von den Untersuchungsbedingungen beschrieben wurde (SCHMALRECK et al. 1995), ergibt sich hier und immer wieder die Frage nach dem Einfluss der Testmethode bei der Bewertung von unterschiedlichen Testergebnissen.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, an klinischen Hefe-Isolaten aus dem Mundraum die Empfindlichkeitsverteilung gegenüber Amphotericin B und Fluconazol zu ermitteln, sowie modellhaft deren Veränderung in Abhängigkeit von der Testmethode und dem Testmedium zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Klinische Isolate

2.1.1 Testphase I

Untersucht wurden 145 klinische Isolate der mykologischen Routinediagnostik des Instituts für medizinische Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Entsprechend der Zielsetzung setzte sich das Stammkollektiv größtenteils aus Isolaten des Mund-Rachen(MR)-Bereich (n = 121) zusammen, die orientierend durch Isolate von anderen Körperregionen ergänzt wurden (Tab. M 01).

Tab. M 01: Gattungs- und Artverteilung der klinischen Hefe-Isolate der Testphase I
– numerische Häufigkeit und Prozentverteilung

Art	Abkürzung	Gesamt		MR-Bereich		Andere	
		n	%	n	%	n	%
<i>Candida (C.) albicans</i>	Calb	91	62,8	89	73,0	2	8,7
<i>C. dubliniensis</i>	Cdub	4	2,8	3	2,5	1	4,3
<i>C. glabrata</i>	Cgla	11	7,6	9	7,4	2	8,7
<i>C. kefyr</i>	Ckef	3	2,1	2	1,6	1	4,3
<i>C. krusei</i>	Ckru	4	2,8	3	2,5	1	4,3
<i>C. lusitaniae</i>	Clus	4	2,8	2	1,6	2	8,7
<i>C. norvegensis</i>	Cnor	5	3,5	2	1,6	3	13
<i>C. parapsilosis</i>	Cpar	5	3,5	5	4,1		
<i>C. pelliculosa</i>	Cpel	3	2,1	1	0,8	2	8,7
<i>C. tropicalis</i>	Ctro	4	2,8	4	3,3		
<i>Geotrichum (G.) capitatum</i>	Gcap	3	2,1	1	0,8	2	8,7
<i>Rhodotorula (R.) mucilaginosa</i>	Rmuc	2	1,4	1	0,8	1	4,3
<i>Saccharomyces (S.) cerevisae</i>	Scer	3	2,1			3	8,7
<i>Trichosporum (T.) mucoides</i>	Tmuc	3	2,1			3	8,7
Total		145	100	122	100	23	100

MR-Bereich = Mund-/Rachen-Bereich

Die Gattungs- und Artdifferenzierung erfolgte mittels Mikromorphologie und Biochemie der Hefen (KUTZMAN et al. 1998; BARNETT et al. 1983; LODDER 1971) sowie teilweise durch den API ID32C der Firma BioMérieux.

Beide Sub-Kollektive (MR-Bereich und „Andere“) beinhalteten jeweils Material aus verschiedenen Körperregionen (Tabellen-Anhang: Tab. M 02). Für weitergehende Untersuchungen in dieser Arbeit wurden überwiegend Isolate aus dem Mund- und Rachenbereich verwendet.

2.1.2 Testphase II

Das Test-Kollektiv wurde zusammengesetzt aus 59 klinischen Isolaten, die in der Testphase I ein verlässliches Wachstum gezeigt hatten (Tab. M 03).

Tab. M 03: Gattungs- und Artverteilung der klinischen Hefe-Isolate der Testphase II
– numerische Häufigkeit und Prozentverteilung

Art	Abkürzung	n	%
<i>Candida (C.) albicans</i>	Calb	44	74,5
<i>C. dubliniensis</i>	Cdub	2	3,4
<i>C. kefyr</i>	Ckef	1	1,7
<i>C. krusei</i>	Ckru	1	1,7
<i>C. norvegensis</i>	Cnor	2	3,4
<i>C. parapsilosis</i>	Cpar	1	1,7
<i>C. pelliculosa</i>	Cpel	2	3,4
<i>C. tropicalis</i>	Ctro	4	6,8
<i>Trichosporum mucoides</i>	Tmuc	2	3,4
Total (N)		59	100

Der überwiegende Teil des Kollektivs stammte auch in der Testphase II aus dem Mund-/Rachen-Bereich. Darüber hinaus wurden fünf Isolate (zwei *Trich. mucoides*, zwei *C. pelliculosa* und ein *C. kefyr*) aus dem bronchiopulmonalen Bereich isoliert.

2.2 Qualitäts-Kontrollstämme

Zur Qualitätssicherung der Untersuchung wurden bei jedem Testansatz beider Testphasen neben den klinischen Isolaten je zwei Qualitäts-Kontrollstämme (= QC-Stämme) mitgeführt (Tab. M 04).

Tab. M 04: Qualitative Artverteilung der verwendeten QC-Stämme und Anzahl der Testdurchläufe

Hefe-Art	ATCC - Stämme	DSM - Stämme	Anzahl der Testdurchläufe	
			Testphase I	Testphase II
<i>C. albicans</i>	ATCC 90028	(DSM 11225)	3	/
<i>C. albicans</i>	ATCC 24433	(DSM 11948)	3	2
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 90874	(DSM 11951)	3	3
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 750	(DSM 11953)	3	3
<i>C. glabrata</i>	ATCC 90030	(DSM 11226)	3	2
<i>C. glabrata</i>	/	DSM 11950	3	2
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	(DSM 5784)	3	2
<i>C. parapsilosis</i>	/	DSM 11955	3	/
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	(DSM 11956)	3	2
<i>C. guilliermondii</i>	ATCC 90877	/	3	/

ATCC = American Type Culture Collection

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

() = Der ATCC-Stamm entspricht dem DSM-Stamm

QC-Stämme = Qualitäts-Kontrollstämme

2.3 Nährmedien im Überblick

Als Medien wurden für die Empfindlichkeitstestung das Yeast-Susceptibility-Test Medium (YST) gemäß DIN 58 940-84 sowie Antibiotika Medium 3 in der ersten Testphase verwendet. Für die Qualitätskontrolle und in der zweiten Testphase wurde ergänzend RPMI1640 (RPMI-E) in Anlehnung an das CLSI-Protokoll M27-A2 eingesetzt. Alle drei Medien sowie die RPMI-Varianten der zweiten Untersuchungsphase (RPMI-MB, RPMI-S) wurden auf eine einheitliche Glucose-Endkonzentration von 2% Glucose vor Versuchsansatz eingestellt (Tab. M 05). Die Herstellung der Medien erfolgte gemäß Herstellerangaben.

Tab. M 05: Nährmedien für die Empfindlichkeitstestung und der Vorkultur im Überblick

Abkürzung	Medien	Hersteller	Nr.	Puffersystem, pH-Wert	Methylenblau
YST	Yeast-Susceptibility Testmedium	Sefin	TN1283	Phosphat-Puffer nach Sørensen; pH 7.0	0,5mg/l
RPMI-E	RPMI1640	Biochrom	#T121-01	MOPS; pH 7.0	÷
RPMI-MB	RPMI1640	Biochrom	#T121-01	MOPS; pH 7.0	0,5mg/l
RPMI-S	RPMI1640	Biochrom	#T121-01	Phosphat-Puffer nach Sørensen; pH 7.0	0,5mg/l
AM3	Antibiotika Medium 3	Difco	224320	Kaliumphosphat-Puffer; pH 7,0	÷
Vorkultur					
Kimmig-Agar	Pilz-Agar nach Kimmig	Merck	1.05414	pH 6,5	÷
Chrom-Agar	MAST ID – Chrom-Agar® <i>Candida</i>	Mast	CA 223	pH 6,3	÷

Für den E-Test wurden entsprechende Agarplatten durch den Zusatz von 1% Sobigel-Agar (Fa. MAST) hergestellt, so dass die Nährmedien im E-Test und in der Mikrodilutions-Testung sich entsprachen.

Die Vorkultur wurde auf Kimmig-Agar durchgeführt und eine visuelle Überprüfung auf das Vorliegen einer Reinkultur mittels Chrom-Agar ergänzend durchgeführt. Die Unterschiede der Medien sind der Tabelle M 04 zu entnehmen

2.4 Vorbereitende Maßnahmen

Für einen Versuchsansatz wurden die jeweiligen Kontrollstämme und klinischen Isolate, die bei -70°C gelagert worden waren, ausgefroren und auf Kimmig-Agar angezüchtet. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden erfolgte eine Subkultur auf Chrom-Agar mittels eines 3-Ösen-Ausstriches zur visuellen Überprüfung der Hefestämme. Bei Vorliegen einer entsprechenden Reinkultur wurde eine Subkultur auf Kimmig-Agar angelegt, die nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden als Ausgangsplatte für die Untersuchungen genutzt wurde.

Die Inkubation der Isolate erfolgte für alle Kulturen und Versuchsansätze bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.5 Erstellen des Inokulums

Als Ausgang für das Inokulum wurden 5-7 Kolonien des entsprechend angezüchteten Hefe-Isolats in 2ml 0,9%ige Kochsalzlösung suspendiert und mit einem Vortex-Gerät durchmischt (Basissuspension). Durch tropfenweise Zugabe der Basissuspension in 4ml 0,9%ige NaCl-Lösung und anschließendes Durchmischen (Vortex-Gerät) wurde ein gemeinsames Ausgangs-Inokulum für die vergleichenden Untersuchungen vorbereitet. Dabei wurde ein Trübungsstandardwert von McFaland 0,5 photometrisch eingestellt.

Von dieser Ausgangssuspension wurden 200 μl in 4ml 0,9%iger NaCl-Lösung weiterverdünnt.

Während diese erste Verdünnung (von 1:20) das Inokulum für die E-Test-Ansätze darstellte, erfolgte für das Inokulum des Mikrodilutionstests eine weitere Verdünnung von 200µl der ersten Verdünnung in 11 ml des verwendeten Testmediums (z. B. YST).

Die Bestimmung der Keimzahl des Inokulms wurde mit 10µl des Inokulums der Mikrodilution (# 2) nach der Methode der Colony Forming Units durchgeführt (Tab. M 06).

Tab. M 06: Verdünnungsschema für die im Rahmen der verschiedenen Untersuchungen verwendeten Inokula.

Inokulum	#	Verdünnungsschema	Inokulum Bereich (cfu)
Basissuspension	B	5 Kolonien in 2 ml 0,9%iger NaCl-Lösung	
Ausgangs-Inokulum	0	4 ml 0,9%iger NaCl-Lösung + x Tropfen (B) bis McFarland 0,5 erreicht	10^6
E-Test -Inokulum	1	0,2 ml (# 0) + 4ml 0,9%iger NaCl-Lösung	10^5
Mikrodilution-Inokulum	2	0,2 ml (# 1) + 11 ml Medium	10^3
cfu - Bestimmung	3	10 µl (# 2) im 8 Ösen-Ausstrich auf Chrom-Agar	

cfu = colony forming units

2.6 E-Test

2.6.1 Anlage

Mittels eines mit dem Inokulum #1 getränkten Wattestäbchens wurde die Verdünnung im 8-Ösen-Ausstrich auf den jeweiligen Nährboden aufgetragen. In der Regel wurden zwei E-Test Streifen (AB BIODISK; Solana, Schweden) gegenseitig zueinander auf eine Medium-Platte platziert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 36°C ±1. Die Inkubationszeit betrug 24 bzw. 48 Stunden.

2.6.2 Antimykotika

In der Testphase I wurden die klinischen Isolate jeweils gegenüber Amphotericin B und Fluconazol getestet.

In der Testphase II fand der E-Test der klinischen Isolate ausschließlich gegenüber Amphotericin B statt.

Die Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämme wurde in beiden Testphasen gegenüber den Antimykotika Amphotericin B (APH), Flucytosin (FCY), Fluconazol (FCA), Itraconazol (ITR), Voriconazol (VOR), Posaconazol (POS), Caspofungin (CAS) und Anidulafungin (ANF) untersucht.

2.6.3 Nährmedien in den verschiedenen Testphasen

In der Testphase I wurden zur Untersuchung der klinischen Isolate gegenüber Amphotericin B die Medien Yeast-Susceptibility-Test-Agar (YST) und Antibiotika-Medium3 (AM3) verwendet. Die Testung der Isolate gegenüber Fluconazol fand ausschließlich auf YST statt.

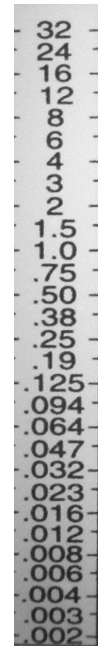
Die Kontrollstämme der Testphase I wurden parallel auf den Nährmedien YST und RPMI-E getestet. Die Testung von Amphotericin B erfolgte auch hier zusätzlich auf Antibiotika-Medium3.

In der Testphase II wurden alle Stämme (klinische Isolate und Kontrollstämme) parallel auf den Medien YST, RPMI-E, RPMI-MB, und RPMI-S untersucht.

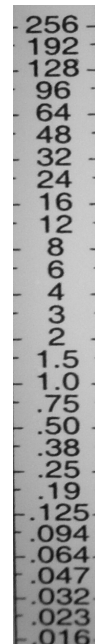
Die Konzentrationsstufen der Antimykotika des E-Tests entstanden jeweils durch 2 ineinander geschobene geometrische Verdünnungen um den Faktor 2 (Abb. M 01).

Abb. M 01: Konzentrationsstufen (mg/l) der E-Teststreifen

- a) für die Antimykotika Amphotericin B, Flucytosin,
Voriconazol, Posaconazol, Itraconazol,
Caspofungin und Anidulafungin



- b) für das Antimykotikum Fluconazol



2.6.4 Ablesung der E-Teste

Als minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde diejenige Konzentrationsstufe des E-Test-Streifens notiert, die den Außenrand des Hemmhofs dort schnitt, wo eine eindeutige Wachstumshemmung erkennbar war. Bei nicht scharfen Hemmzonen oder anderen Wachstumsphänomenen wurde gemäß den Herstellervorgaben die Beurteilung vorgenommen.

Parallel erfolgte die visuelle Bestimmung der Wachstumsdichte (eingeteilt in Stufen von 0 bis 4 ansteigend) im peripheren Bereich der inkubierten Platte. Betrug das Wachstum nach 24 Stunden weniger als eine Dichte von 2, erfolgte nach 72 Stunden eine dritte Ablesung des betreffenden Stammes.

2.7 Mikrodilutionstest

2.7.1 Anlage und Antimykotika

Der Mikrodilutionstest erfolgte sowohl bei den klinischen Isolaten als auch bei den QC-Stämmen mittels der sterilen Ready-to-use Mikrodilutionsplatte zur Empfindlichkeitstestung „Micronaut-AM KH“ (E1-816-200, Merlin, Bornheim-Hersel), auf der die Antimykotika Ketoconazol (KET), Itraconazol (ITR), Fluconazol (FCA), Voriconazol (VOR), Flucytosin (FCY) und Amphotericin B (APH) vertreten waren.

Auf jeder Platte wurden je 2 Isolate parallel getestet. Für jede Testung war eine Kontrollkavität für die Wachstumskontrolle (= Growth-Control = GC) und mit den Antimykotika beimpfte Testkavitäten verschiedener Konzentrationsstufen vorgesehen (Abb. M 02). Mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette wurden in jede Kavität einer Plattenhälfte je 200µl des mit dem jeweiligen Testmedium eingestellten Inokulums (Verdünnung #2; Tab. M 06) gegeben.

Die zweite Hälfte der Platte wurde entsprechend mit dem Inokulum eines anderen Isolats beimpft. Die Inkubationszeit betrug auch hier 24 bzw. 48 Stunden bei 36°C ±1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KET 0,125	KET 2	ITR 0,25	ITR 4	FCA 8	FCA 128	VOR 0,5	VOR 8	FCY 4	FCY 64	APH 0,5	APH 8
B	KET 0,063	KET 1	ITR 0,125	ITR 2	FCA 4	FCA 64	VOR 0,25	VOR 4	FCY 2	FCY 32	APH 0,25	APH 4
C	KET 0,031	KET 0,5	ITR 0,063	ITR 1	FCA 2	FCA 32	VOR 0,125	VOR 2	FCY 1	FCY 16	APH 0,125	APH 2
D	GC	KET 0,25	ITR 0,031	ITR 0,5	FCA 1	FCA 16	VOR 0,063	VOR 1	FCY 0,5	FCY 8	APH 0,063	APH 1
E	KET 0,125	KET 2	ITR 0,25	ITR 4	FCA 8	FCA 128	VOR 0,5	VOR 8	FCY 4	FCY 64	APH 0,5	APH 8
F	KET 0,063	KET 1	ITR 0,125	ITR 2	FCA 4	FCA 64	VOR 0,25	VOR 4	FCY 2	FCY 32	APH 0,25	APH 4
G	KET 0,031	KET 0,5	ITR 0,063	ITR 1	FCA 2	FCA 32	VOR 0,125	VOR 2	FCY 1	FCY 16	APH 0,125	APH 2
H	GC	KET 0,25	ITR 0,031	ITR 0,5	FCA 1	FCA 16	VOR 0,063	VOR 1	FCY 0,5	FCY 8	APH 0,063	APH 1

Unter der Abkürzung des Antimykotikums (siehe Text oben) wird jeweils dessen Konzentration (mg/l) in der jeweiligen Kavität angegeben. GC = Growth control

Abb. M 02: Schematische Darstellung der Mikrodilutionsplatte „Micronaut-AM KH“ E1-816-200 zur Empfindlichkeitsbestimmung gegenüber Antimykotika für 2 Isolate. Antimykotika- und Konzentrationsbelegung (Merlin, Bornheim-Hersel).

2.7.2 Nährmedien im Mikrodilutionstest

In der Testphase I wurde als Medium im Mikrodilutionstest bei allen Stämmen (klinischen Isolaten und Kontrollstämmen) gemäß DIN 58940-84 Yeast-Susceptibility-Test-Agar (YST) verwendet.

In der Testphase II fanden die Untersuchungen neben YST in RPMI-E, RPMI-MB und RPMI-S statt.

2.7.3 Ablesung der Mikrodilutionstests

Die Ablesung erfolgte visuell im Vergleich zur Wachstumskontrolle. Als MHK wurde diejenige Konzentration eines Antimykotikums festgesetzt, bei der keine wachstumsbedingte Trübung mehr zu erkennen war, bzw. es zu einem deutlich sichtbaren Trübungseinbruch gekommen war. Letztere Festsetzung der MHK galt insbesondere für die Azolantimykotika.

Bestanden z.B. auf Grund des Vorliegens eines Trailingphänomens Probleme bei der MHK-Festlegung, so wurde die MHK mittels der 80%-Inhibitions-methode festgelegt.

Für die Erstellung des 80%-Inhibitionswertes wurden aus der resuspendierten Wachstumskontrolle 40µl mit einer Pipette entnommen, in eine freie Kavität einer Mikrotiterplatte zu 160µl des entsprechenden Testmediums gegeben und durchmischt. Danach wurden die Kavitäten des Antimykotikums, dessen MHK bestimmt werden sollten, resuspendiert und die Trübung mit der 80%-Inhibitionskontrolle verglichen. Die erste Konzentration, die eine deutlich sichtbar geringere Trübung als die 80% Inhibitionskontrolle zeigte, wurde als MHK festgelegt.

Eine visuelle Beurteilung der Wachstumsdichte (Einteilung in Stufen von 0 bis 4 ansteigend) erfolgte durch Beurteilung der Kontrollkavität. Betrug das Wachstum nach 24 Stunden weniger als eine Dichte von 2, so erfolgte, wie auch beim E-Test, nach 72 Stunden eine dritte Ablesung des betreffenden Stammes.

2.7.4 Kontrolle des Inokulums

Die Bestimmung der Keimzahl aus dem Inokulum diene einerseits der Kontrolle der realen Einsaatmenge und andererseits der Prüfung auf Vorliegen einer Reinkultur. Hierfür wurden 10 µl des #2-Inokulums (welches für die Mikro-

dilutionstestung hergestellt wurde) mittels 8 Ösen-Ausstrich auf Chrom-Agar ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ wurden die gewachsenen Kolonien auf Einheitlichkeit überprüft und gezählt. Das Ergebnis multipliziert mit 100 entsprach der Keimzahl (= colony forming units = cfu) pro ml.

2.8 Auswertung

2.8.1 Allgemeine Anmerkungen

Zur leichteren Veranschaulichung wurden in einigen Tabellen und Abbildungen dieser Arbeit auch dann Prozentangaben angeboten, obwohl das Gesamt-N (N) der jeweiligen Untersuchung kleiner als 100 war.

Für einen Vergleich der beiden Testmethoden (Mikrodilution und E-Test) musste eine Anpassung der E-Test MHK-Werte an das Muster der Verdünnungsreihe des Mikrodilutionstestes durchgeführt werden. Da es sich beim E-Test um zwei ineinander verschobene Verdünnungsreihen handelt, wurden die numerischen Häufigkeiten der MHK-Werte der Zwischenkonzentration des E-Testes jeweils denen der nächst höheren Konzentration im E-Test zugeschlagen.

Verglichen wurden dabei ausschließlich die unter Verwendung von Yeast-Susceptibility-Testagar (YST) ermittelten MHK-Werte.

2.8.2 Deskriptive Auswertungen

Für die Beschreibung der einzelnen MHK-Verteilungen eines Antimykotikums und zum orientierenden Vergleich dieser Verteilungen wurden bei der deskriptiven Auswertung die folgenden Referenzwerte verwendet:

- MHK50: niedrigste Konzentrations-Stufe, bei der mindestens 50% der MHK-Werte erreicht sind.
- MHK90: niedrigste Konzentrations-Stufe, bei der mindestens 90% der MHK-Werte erreicht sind.
- WT-UL: „Wild Typ Upper Limit“, welches 2 geometrische Stufen über dem MHK50-Wert liegt.
- Mode: Konzentrations-Stufe, auf der die meisten minimalen Hemmkonzentrationen angesiedelt sind, Synonym: Modalwert.

2.8.3 Vergleichende Auswertungen auf der Basis der S-I-R-Klassifikation

Da die verschiedenen Antimykotika bzw. Antimykotikagruppen sich in ihren pharmakochemischen Eigenschaften und Wirkmechanismen unterscheiden, wurden vergleichende Auswertungen auf der Basis der S-I-R - Klassifikation durchgeführt. Hierfür wurden die ermittelten MHK-Werte anhand von Antimykotika-spezifischen Breakpoints in die Empfindlichkeitsklassen „Sensibel“ (S), „Intermediär“ (I) und „Resistent“ (R) überführt.

Die hier zu Grunde gelegten Breakpoints (Tab. M 07) für die verschiedenen Antimykotika basieren auf unterschiedlichen Publikationen und sind international anerkannt: Flucytosin, Fluconazol, und Itraconazol (CLSI M27-A2 Protokoll), Voriconazol (PFALLER et al. 2008) und Caspofungin, sowie Anidulafungin (PFALLER et al. 2008).

Tab. M 07: S-I-R-Empfindlichkeitsklassen und ihre Breakpoints. (Stand: 2009)

Empfindlichkeitsklasse	Sensibel	Intermediär	Resistent
Antimykotikum	mg / l	mg / l	mg / l
FCY	≤4,0	> 4 - < 32	≥ 32
AmB ⁺	≤ 0,25	> 0,25 - < 1	≥ 1
FCA	≤ 8,0	> 8 - < 64	≥ 64
VOR	≤1,0	> 1 - < 4	≥ 4
ITR	≤ 0,125	> 0,125 - < 1	≥ 1
CAS	≤ 0,5 - ≤ 2	÷	> 2
ANF	≤ 0,5 - ≤ 2	÷	> 2
FCY = Flucytosin AmB = Amphotericin B KET = Ketoconazol FCA = Fluconazol VOR = Voriconazol ITR = Itraconazol CAS = Caspofungin ANF = Anidulafungin			
⁺ = z.Z. in Diskussion, Werte sind unverbindliche „Arbeits“-Breakpoints, s. Text			

Für Amphotericin B wurden bis heute keine allgemein anerkannten Breakpoints festgelegt. Die hier verwandten Breakpoints für Amphotericin B stellen unverbindliche empirische „Arbeits“-Breakpoints dar. Unter den veränderten pharmakochemischen Eigenschaften der liposomalen Amphotericin B-Präparationen sind sie zurzeit erneut in Diskussion.

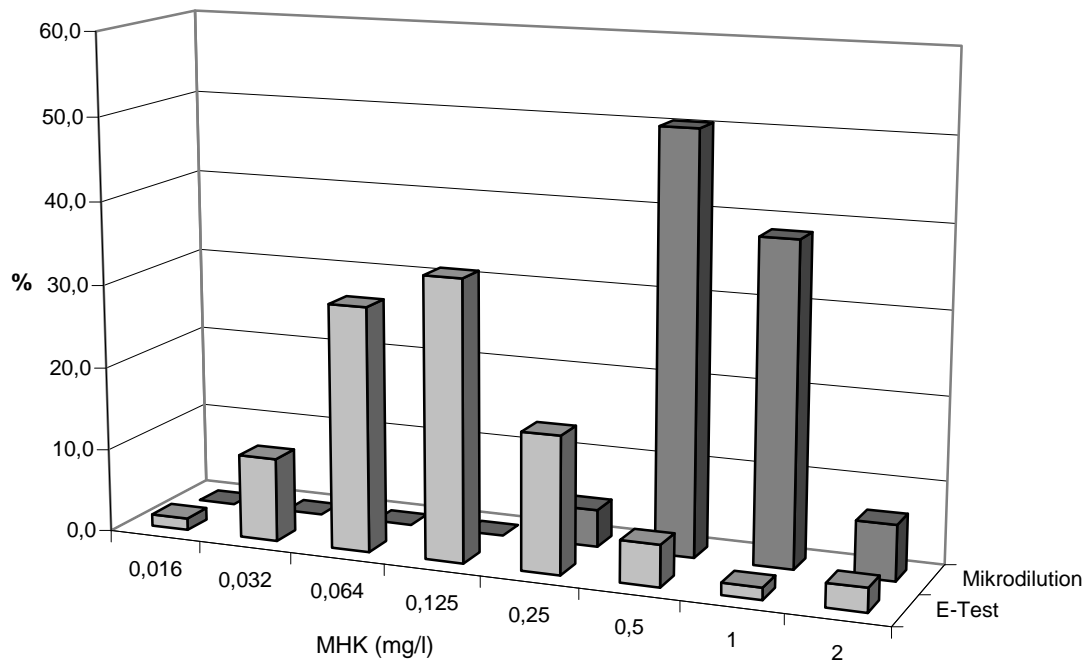
- 3. Ergebnisse der eigenen Untersuchungen
- 3.1 Einfluss der Testmethode (Mikrodilutions- und E-Test) auf die Empfindlichkeitsverteilung
- 3.1.1 Einfluss der Testmethoden bei klinischen Isolaten
- 3.1.1.1 Einfluss der Testmethoden bei klinischen Isolaten auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Amphotericin B

Untersucht wurde das Empfindlichkeitsverhalten des Gesamtkollektivs der klinischen Isolate (n=145). Als Medium wurde YST verwendet.

Bei der Betrachtung nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass die zum Vergleich herangezogenen Referenzwerte (MHK₅₀, MHK₉₀, Mode und WT-UL) beim E-Test niedriger lagen, als in der Mikrodilutionstestung (MDT) (Tab. E 01a; E 01b (Tabellen-Anhang)). Im E-Test reagierten die untersuchten Isolate also deutlich empfindlicher gegenüber Amphotericin B als im Mikrodilutionstest (Abb. E 01).

Bei der Auswertung der einzelnen Subkollektive *C. albicans*, non – *C. albicans* und non – *Candida* ergab sich für die *C. albicans* – Isolate, dass alle Referenzwerte im E-Test drei Konzentrationsstufen unter den entsprechenden Werten in der Mikrodilutionstestung lagen.

Auch nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden waren die Empfindlichkeiten der Isolate gegenüber Amphotericin B im E-Test überwiegend niedriger als in der Mikrodilutionstestung (Abb. E 02): Mit Ausnahme vom MHK₉₀-Wert der non-*C. albicans*-Isolate, der bei beiden Testmethoden gleich war (bei 2mg/L), lagen alle Referenzwerte (MHK₅₀, MHK₉₀, Mode und WT-UL) beim E-Test niedriger, als in der Mikrodilutionstestung (Tab. E 02a; Tabellen-Anhang: E 02b).

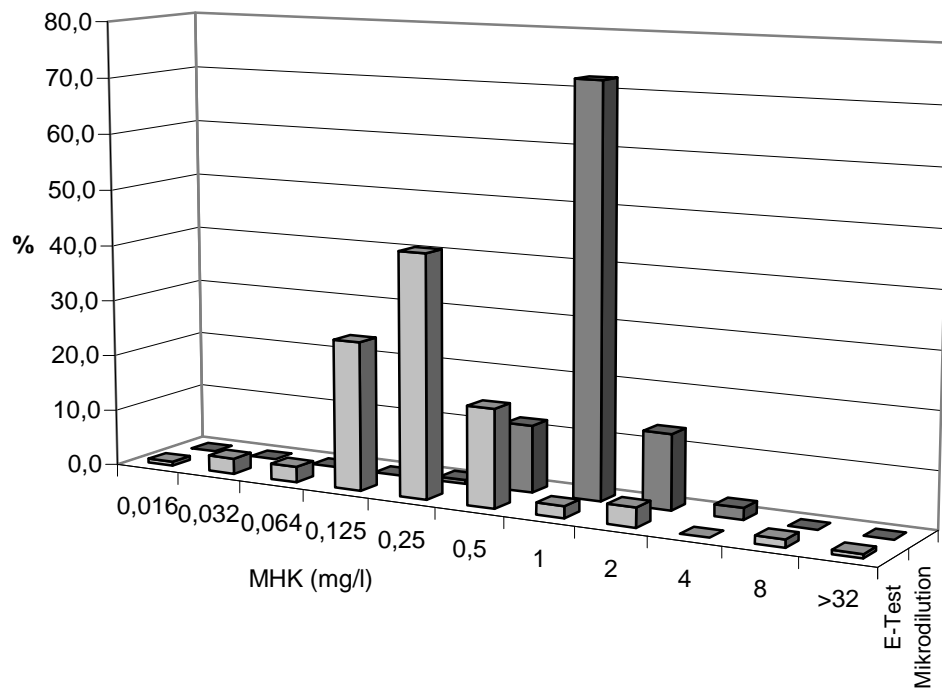


	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2
■ E-Test	1,4	10,0	29,3	33,6	16,4	5,0	1,4	2,9
■ Mikrodilution	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	50,4	38,5	6,7

Abb. E 01: Prozentuale Verteilung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) der Hefen des Gesamtkollektivs gegenüber **Amphotericin B** im Mikrodilutions- und E-Test nach 24 Stunden Inkubationszeit

Tab. E 01a: Verteilung der Referenzwerte (MHK₅₀, MHK₉₀, Mode, Range und WT-UL) gegenüber **Amphotericin B** in den verschiedenen Subkollektiven und Testmethoden nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden.

Kollektiv	Test	n	MHK ₅₀ (mg/l)	MHK ₉₀ (mg/l)	Mode (mg/l)	Range (mg/l)	WT-UL (mg/l)
<i>C. albicans</i>	E-Test	91	0,064	0,125	0,064	0,032 - 0,5	0,25
	MDT	90	0,5	1	0,5	0,25 - 1	2
non- <i>C. albicans</i>	E-Test	40	0,25	1	0,25	0,032 - 2	1
	MDT	37	1	2	1	0,25 - 2	4
non- <i>Candida</i>	E-Test	9	0,125	0,5	0,5	0,016 - 0,5	0,5
	MDT	8	0,5	2	0,5	0,25 - 2	2
Total	E-Test	140	0,125	0,25	0,125	0,016 - 2	0,5
	MDT	135	0,5	1	0,5	0,25 - 2	2



	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	>32
■ E-Test	0,7	2,8	2,8	26,2	42,8	17,2	2,1	3,4	0,0	1,4	0,7
■ Mikrodilution	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	11,8	72,2	13,2	2,1	0,0	0,0

Abb. E 02: Prozentuale Verteilung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) der Hefen des Gesamtkollektivs gegenüber **Amphotericin B** im Mikrodilutions- und E-Test nach **48 Stunden**

Tab. E 02a: Verteilung der Referenzwerte (MHK₅₀, MHK₉₀, Mode, Range und WT-UL) gegenüber **Amphotericin B** in den verschiedenen Subkollektiven und Testmethoden nach einer Inkubationszeit von **48 Stunden**.

Kollektiv	Test	n	MHK ₅₀ (mg/l)	MHK ₉₀ (mg/l)	Mode (mg/l)	Range (mg/l)	WT-UL (mg/l)
<i>C. albicans</i>	E-Test	91	0,25	0,25	0,25	0,032 - >32	1
	MDT	91	1	1	1	0,5 - 2	4
non- <i>C. albicans</i>	E-Test	43	0,5	2	0,5	0,032 - 8	2
	MDT	43	1	2	1	0,25 - 4	4
non- <i>Candida</i>	E-Test	11	0,5	1	0,5	0,016 - 2	2
	MDT	10	1	2	1	0,5 - 4	4
Total	E-Test	145	0,25	0,5	0,25	0,016 - >32	1
	MDT	144	1	2	1	0,25 - 4	4

Bei Betrachtung der einzelnen Subkollektive *C. albicans*, non – *C. albicans* und non – *Candida* wurde deutlich, dass die größten Differenzen, wie schon nach 24 Stunden, bei den *C. albicans* – Isolaten resultierten: Bei diesem Subkollektiv lagen im E-Test alle Referenzwerte zwei Konzentrationsstufen unter den entsprechenden Werten in der Mikrodilutionstestung. Des Weiteren zeigte sich, dass die ermittelten Werte in der Mikrodilutionstestung sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden in einer kleineren Spannweite an Konzentrationsstufen (Range) lagen, als im E-Test. Die Ergebnisse der Mikrodilutionstestung wiesen also eine größere Homogenität auf als die des E-Tests (Tab. E 01a; E 02a).

Analyse auf der Basis der Einzelwerte

Durch die Differenz zwischen den Ergebnissen von Mikrodilutions- und E-Test wurde die Frage aufgeworfen, ob die in den verschiedenen Testmethoden ermittelten Werte in einer faktoriellen Abhängigkeit im Sinne einer „wenn-dann-Beziehung“ zueinander stehen.

Nur bei vier Isolaten (2,8%) stimmten die MHK-Werte der Mikrodilution und des E-Testes direkt überein. Im Bereich von ± 1 Verdünnungsstufe belief sich die Übereinstimmung auf 22,2% (n=32) und bei einem Bereich von ± 2 Verdünnungsstufen auf 66,7 % (n=96) (Tab. E 03). In 32,6% (n=47) der Isolate waren die MHK-Werte des E-Testes signifikant niedriger als die des Mikrodilutionstestes. Nur bei einem Isolat (0,7%), einem *C. albicans*-Stamm, war im Mikrodilutionstest das MHK-Ergebnis signifikant niedriger als im E-Test.

Eine konkrete „wenn – dann – Beziehung“ zwischen den MHK-Werten der beiden Testmethoden konnte nicht verifiziert werden (Korrelationskoeffizient $r=0,384$). So verteilten sich z.B. die 104 Isolate, die in der Mikrodilutionstestung einen MHK-Wert von 1 mg/l aufwiesen, im E-Test mit ihren MHK-Werten auf sechs verschiedene Konzentrationen zwischen 0,032mg/l und 2 mg/l (Tab. E 03).

Tab. E 03: Numerische Korrelation der MHK-Werte des Mikrodilutions- und des E-Tests gegenüber **Amphotericin B** auf der Basis der einzelnen Hefe-Isolate. (Inkubationszeit: 48 Std.)

MHK-APH	E-Test (mg/l)											
MDT (mg/l)	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	>32	Total
>32												
8												
4			1					2				3
2				2	5	5	2	2	1	1	1	19
1		1	1	31	53	17		1				104
0,5	1	2	2	5	4	2	1					17
0,25		1										1
0,125												
≤ 0,064												
Total	1	4	4	38	62	24	3	5		2	1	144

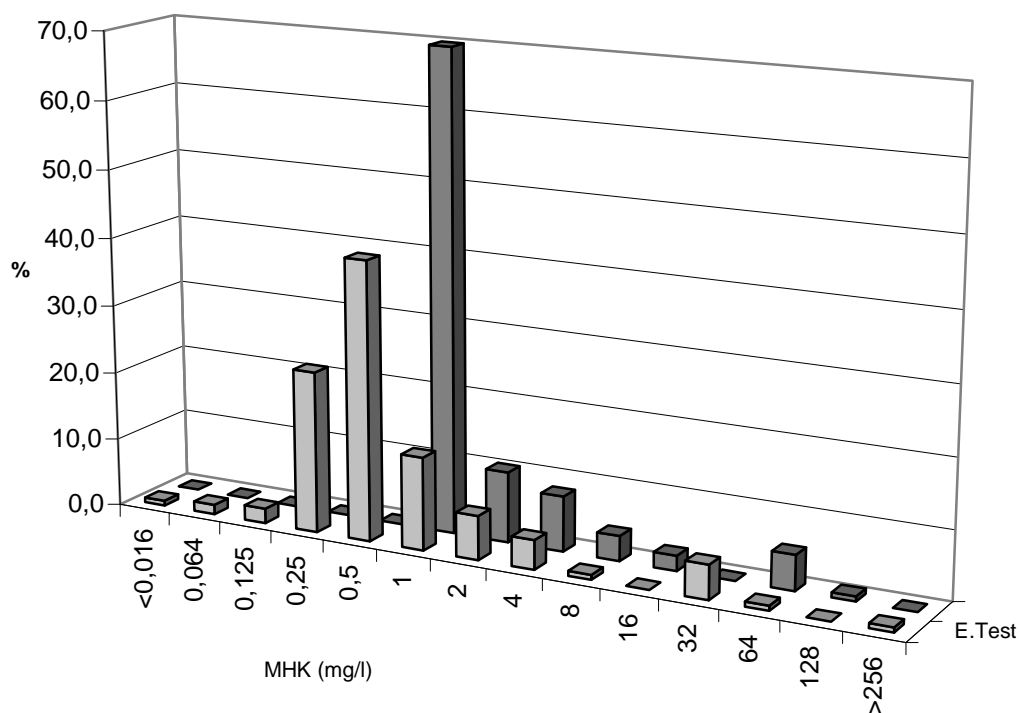
Dunkelgrau eingefärbt ist der Bereich, indem bei beiden Testverfahren gleiche Konzentrationen vorliegen (hellgrauer Bereich: ± 1 geometrische Stufe)

3.1.1.2 Einfluss der Testmethoden bei klinischen Isolaten auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Fluconazol

Zunächst wurde wieder das Empfindlichkeitsverhalten des Gesamtkollektivs der klinischen Isolate in beiden Testverfahren nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden beurteilt: Dabei wurde anhand der Referenzwerte MHK₅₀, MHK₉₀, Mode und WT-UL deutlich, dass gegenüber Fluconazol im E-Test zwar ebenfalls niedrigere MHK-Werte ermittelt wurden als in der Mikrodilutionstestung, die Differenz jedoch nicht relevant (= weniger als eine Konzentrationsstufe) war (Abb. E 03, Tab. E 04a; Tabellen-Anhang: E 04b).

Tab. E 04a: Verteilung der Referenzwerte (MHK₅₀, MHK₉₀, Mode, Range und Wild typ upper limit (WT-UL)) gegenüber **Fluconazol** für die unterschiedlichen Testmethoden (Mikrodilutions- und E-Test) nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 Stunden

Inkubationszeit (Std.)	Test	n	MHK ₅₀ (mg/l)	MHK ₉₀ (mg/l)	Mode (mg/l)	Range (mg/l)	WT-UL (mg/l)
24	E-Test	140	0,5	4	0,5	<0,016 - >128	2
	MDT	136	≤1	8	≤1	≤1 - 128	4
48	E-Test	145	0,5	8	0,5	<0,016 - >128	2
	MDT	144	≤1	16	≤1	≤1 - >128	4



	<0,016	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>256
■ E-Test	0,7	1,4	2,1	23,6	40,7	13,6	6,4	4,3	0,7	0,0	5,0	0,7	0,0	0,7
■ Mikrodilution	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	69,9	10,3	8,1	3,7	2,2	0,0	5,1	0,7	0,0

Abb. E 03: Prozentuale Verteilung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) der Hefen des Gesamtkollektivs gegenüber **Fluconazol** im Mikrodilutions- und E-Test nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden zeigte sich im Empfindlichkeitsverhalten des Gesamtkollektivs eine ebenso geringe Differenz zwischen den MHK-Werten von Mikrodilutions- und E-Test wie nach 24 Stunden.

Analyse auf der Basis der Einzelwerte

Eine Analyse der Einzelwerte der Testung gegenüber Fluconazol unter den gleichen Maßgaben wie für Amphotericin B zeigte ebenfalls eine niedrige direkte Übereinstimmung zwischen den MHK-Werten der Mikrodilutionsteste und denen der E-Teste mit 9,7% (n=14) der Isolate. Deutlich höher war jedoch der Prozentsatz an Übereinstimmungen im Bereich von ± 1 Konzentrationsstufe mit 50,7% (n=73) bzw. mit 88,2% (n=127) im Bereich von ± 2 Verdünnungsstufen (Tab. E 05).

Tab. E 05: Numerische Korrelation der MHK-Werte des Mikrodilutions- und des E-Tests gegenüber **Fluconazol** auf der Basis der einzelnen Hefe-Isolate.

MHK-FCA	E-Test (mg/l)												Total	
	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	> 128		
>128			2											2
128									2	4	1	1		8
64								1		1				2
32						1	1							2
16						3	2	1					1	7
8				1	4	3	1							9
4		4	1	8	3	1		1						18
2			16	6	1	1								24
≤ 1	6	18	40	8										72
Total	6	22	59	23	8	9	4	3	2	5	1	2		144

Dunkelgrau eingefärbt ist der Bereich, in dem bei beiden Testverfahren gleiche Konzentrationen vorliegen

Während bei 16 Isolaten (11,1%) die MHK-Werte der E-Teste signifikant niedriger lagen, war dies bei einem Isolat, einem *C. albicans* - Stamm aus einem Rachenabstrich, umgekehrt.

3.1.1.3 Einfluss der Testmethoden bei klinischen Isolaten auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Amphotericin B im Vergleich zu Fluconazol

Wie bereits beschrieben, lagen bei beiden Antimykotika (APH, FCA) die MHK-Werte der Hefen im E-Test niedriger, als in der Mikrodilutionstestung (Tab. E 01a – E 04b). Gegenüber Amphotericin B erwies sich das Empfindlichkeitsverhalten der untersuchten Isolate in stärkerem Maße von der Testmethode abhängig als gegenüber Fluconazol.

Die pharmakokinetischen, -dynamischen und –chemischen Eigenschaften der einzelnen Antimykotika lassen einen direkten Vergleich bezogen auf die MHK-Werte nicht zu. So wurde der Vergleich über die Anzahl der Konzentrationsstufen zwischen Mikrodilutions- und E-Test bei den einzelnen Referenzwerten der Antimykotika durchgeführt (Tab. E 06).

Tab. E 06: Anzahl der geometrischen Konzentrationsstufen zwischen den Referenzwerten des Mikrodilutions- und des E-Tests nach 24 und 48 Stunden (Konzentrationsangaben in mg/L).

Inkubationszeit (Stunden)	Amphotericin B				Fluconazol			
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	Mode	WT-UL	MHK ₅₀	MHK ₉₀	Mode	WT-UL
24	2	2	2	8	1	1	1	4
48	2	2	2	8	1	1	1	4

3.1.2 Einfluss der Testmethoden bei Kontrollstämmen

3.1.2.1 Einfluss der Testmethoden auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Amphotericin B

Bei der Untersuchung der Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämmen gegenüber Amphotericin B (APH) bei Anwendung der unterschiedlichen Testmethoden fand sich, dass sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden alle MHK-Werte im E-Test niedriger waren als in der Mikrodilutionstestung (Tab. E 07a; Tabellen-Anhang: E 07b). Dies entspricht den Ergebnissen der Untersuchungen an den klinischen Isolaten (Tab. E 01a – E 02b).

Tab. E 07a: Verteilung der Referenzwerte (MHK₅₀, MHK₉₀, Mode, Range und WT-UL) gegenüber Amphotericin B für die unterschiedlichen Testmethoden (Mikrodilutions- und E-Test) nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 Stunden

Inkubationszeit (Std.)	Test	n	MHK ₅₀ (mg/l)	MHK ₉₀ (mg/l)	Mode (mg/l)	Range (mg/l)	WT-UL (mg/l)
24	E-Test	26	0,125	0,5	0,125	0,016 - 0,5	0,5
	MDT	25	1	2	1	0,25 - 2	4
48	E-Test	29	0,25	1	0,25	0,032 - 1	1
	MDT	26	1	2	1	0,5 - 2	4

3.1.2.2 Einfluss der Testmethoden auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Fluconazol

Bei der Untersuchung der Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämmen gegenüber Fluconazol zeigte sich, dass – wie schon bei der Untersuchung an klinischen Isolaten (Tab. E 04a; E 04b) – in der Mikrodilutionstestung höhere MHK-Werte resultierten als im E-Test. So lagen die Referenzwerte MHK₅₀, Mode und Range in der Mikrodilutionstestung höher als im E-Test (Tab. E 08a; Tabellen-Anhang: E 08b). Die Differenz zwischen den Ergebnissen der

verschiedenen Testmethoden war jedoch nicht so deutlich wie bei der Testung der Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämme gegenüber Amphotericin B (Tab. E 07a; E 07b).

Tab. E 08a: Verteilung der Referenzwerte (MHK₅₀, MHK₉₀, Mode, Range und WT-UL) gegenüber Fluconazol für die unterschiedlichen Testmethoden (Mikrodilutions- und E-Test) nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 Stunden

Inkubationszeit (Std.)	Test	n	MHK ₅₀ (mg/l)	MHK ₉₀ (mg/l)	Mode (mg/l)	Range (mg/l)	WT-UL (mg/l)
24	E-Test	26	1	32	0,5	0,5 - 32	4
	MDT	25	4	8	4	1 - 64	16
48	E-Test	29	2	64	1	0,5 - 64	8
	MDT	26	4	64	4	1 - 64	8

3.1.2.3 Einfluss der Testmethoden auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Voriconazol

Bei der Untersuchung der Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämme gegenüber Voriconazol (VOR) bei Anwendung der unterschiedlichen Testmethoden fand sich, dass sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden die meisten MHK-Werte im E-Test niedriger waren als in der Mikrodilutionstestung. Einzig für den Modalwert traf dies nicht zu (Tab. E 09a; Tabellen-Anhang: E 09b (Tabelle-Anhang)). Auch gegenüber dem Antimykotikum Voriconazol resultierten also im E-Test überwiegend niedrigere Werte als in der Mikrodilutionstestung.

Tab. E 09a: Verteilung der Referenzwerte (MHK₅₀, MHK₉₀, Mode, Range und WT-UL) gegenüber Voriconazol für die unterschiedlichen Testmethoden (Mikrodilutions- und E-Test) nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 Stunden

Inkubationszeit (Std.)	Test	n	MHK ₅₀ (mg/l)	MHK ₉₀ (mg/l)	Mode (mg/l)	Range (mg/l)	WT-UL (mg/l)
24	E-Test	26	0,032	0,125	0,032	0,016 - 0,25	0,125
	MDT	25	0,125	0,5	<0,064	<0,064 - 1	0,5
48	E-Test	29	0,064	0,25	0,125	0,004 - 0,25	0,25
	MDT	26	0,25	2	<0,064	<0,064 - 4	1

3.1.2.4 Einfluss der Testmethoden auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Flucytosin

Bei dieser Untersuchung ließen sich kaum relevante Unterschiede im Empfindlichkeitsverhalten der Stämme in den verschiedenen Testverfahren feststellen (Tab. E 10a; Tabellen-Anhan: E 10b): Einzig der Modalwert lag mit >32mg/l im E-Test höher als in der Mikrodilutionstestung (≤0,5 mg/l). Verglichen mit den bisher untersuchten Antimykotika ergab sich hier eine entgegengesetzte Tendenz.

Tab. E 10a: Verteilung der Referenzwerte (MHK₅₀, MHK₉₀, Mode, Range und WT-UL) gegenüber Flucytosin bei den unterschiedlichen Testmethoden (Mikrodilutions- und E-Test) nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 Stunden

Inkubationszeit (Std.)	Test	n	MHK ₅₀ (mg/l)	MHK ₉₀ (mg/l)	Mode (mg/l)	Range (mg/l)	WT-UL (mg/l)
24	E-Test	26	0,125	>32	0,064	0,008 - >32	0,5
	MDT	25	≤0,5	>32	≤0,5	≤0,5 - >32	2
48	E-Test	29	0,5	>32	>32	0,004 - >32	2
	MDT	26	1	>32	≤0,5	≤0,5 - >32	4

3.1.2.5 Einfluss der Testmethoden auf das Empfindlichkeitsverhalten gegenüber Itraconazol

Bei der Testung gegenüber Itraconazol ergab sich, dass in der Mikrodilutionstestung zum Teil relevant niedrigere MHK-Werte der Hefen resultierten als im E-Test (Tab. E 11a; Tabellen-Anhang: E 11b): Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden lagen die Referenzwerte im E-Test je nach Wert ein bis fünf geometrische Stufen über den entsprechenden Ergebnissen in der Mikrodilutionstestung. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden lagen MHK₅₀, MHK₉₀ und der WT-UL-Wert im E-Test höher, während der Modalwert in der Mikrodilutionstestung bei einer höheren Konzentration lag.

Tab. E 11a: Verteilung der Referenzwerte (MHK₅₀, MHK₉₀, Mode, Range und WT-UL) gegenüber Intraconazol für die unterschiedlichen Testmethoden (Mikrodilutions- und E-Test) nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 Stunden

Inkubationszeit (Std.)	Test	n	MHK ₅₀ (mg/l)	MHK ₉₀ (mg/l)	Mode (mg/l)	Range (mg/l)	WT-UL (mg/l)
24	E-Test	26	0,25	1	0,063; 0,25; 1	≤0,032 - 4	1
	MDT	25	0,063	0,5	≤0,032	≤0,032 - 1	0,25
48	E-Test	29	0,25	>4	0,063	0,032 - 4	1
	MDT	26	0,125	1	1	≤0,032 - 2	0,5

Bei allen Antimykotika, außer bei Flucytosin, ließ sich ein Einfluss der Testmethode auf die Empfindlichkeitsverteilung der untersuchten Hefen feststellen. Bei drei Antimykotika (APH, FCA und VOR) wurden im E-Test für die Hefe-Isolate niedrigere MHK-Werte festgestellt als bei der Testung mittels Mikrodilutionstestung. Mit Ausnahme des Modalwerts verhielten sich die untersuchten Hefen hinsichtlich der Referenzwerte gegenüber Itraconazol umgekehrt.

3.2 Einfluss der Nährmedien auf die Empfindlichkeitsverteilung von klinischen Isolaten

3.2.1 unter Verwendung des Yeast-Susceptibility-Testmediums (YST) im Vergleich zum Antibiotika-Medium 3 (AM3)

3.2.1.1 im E-Test gegenüber Amphotericin B

Für das Gesamtkollektiv der klinischen Isolate (N=140) zeigte sich im E-Test nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden, dass die ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) gegenüber Amphotericin B (APH) unter Verwendung des Nährmediums Antibiotika-Medium 3 (AM3) geringfügig niedriger ausfielen als in Yeast-Susceptibility-Testmedium (YST) (Abb. E 04). Auf das Gesamtkollektiv bezogen machte die Differenz bei den Referenzwerten (MHK₅₀, MHK₉₀, Mode und WT-UL) ein bis zwei Konzentrationsstufen im E-Test aus (Tab. E 12a).

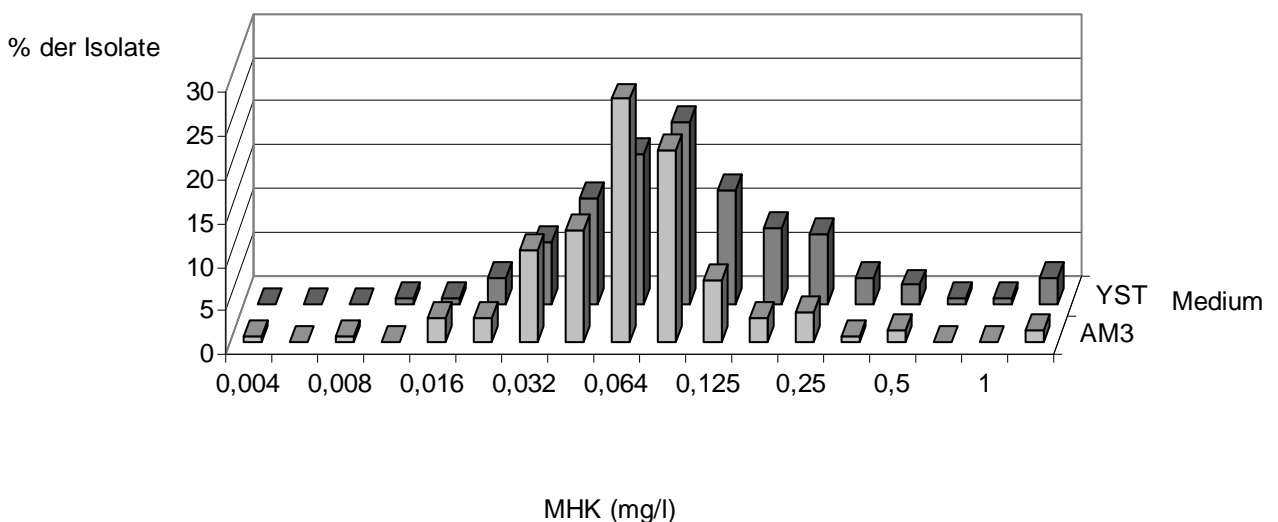


Abb. E 04: Empfindlichkeitsverteilung des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit der unterschiedlichen Medien (AM3 und YST)

Tab. E 12a: Empfindlichkeitsverteilung der Referenzwerte gegenüber **Amphotericin B** in Abhängigkeit der Nährmedien (AM3; YST) nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im E-Test

Kollektiv	Medium	n	MHK50 (mg/l)	MHK90 (mg/l)	Mode (mg/l)	WT-UL (mg/l)
<i>C. albicans</i>	AM3	91	0,064	0,094	0,064	0,19
	YST	91	0,064	0,125	0,094	0,25
Non - <i>C. albicans</i>	AM3	42	0,064	0,25	0,032	0,38
	YST	40	0,19	1	0,25	2
Non - <i>Candida</i>	AM3	10	0,032	0,25	0,032	0,5
	YST	9	0,125	0,5	0,38	0,75
Total	AM3	143	0,064	0,19	0,064	0,19
	YST	140	0,094	0,25	0,094	0,38

Zur weiteren differenzierteren Untersuchung wurde das Gesamtkollektiv in drei Subkollektive unterteilt: *Candida (C.) albicans* – Isolate, non - *C. albicans* - Isolate (*C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* und *C. tropicalis*) und non – *Candida* – Isolate (*Geotrichum capitatum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Trichosporum mucoides*).

Bei allen drei Subkollektiven fanden sich unter Verwendung von AM3 tendenziell niedrigere MHK-Werte als bei YST (Tabellen-Anhang: Tab. E 12b). Für die non – *C. albicans*- und die non – *Candida* – Isolate lagen sämtliche Referenzwerte unter Verwendung von AM3 niedriger als auf YST, bei den *C. albicans* – Isolaten alle bis auf MHK50 (dieser Referenzwert war auf beiden Medien identisch). Am Größten war die Differenz zwischen den entsprechenden Werten bei dem Subkollektiv der non – *Candida* – Isolate: Hier war z.B. der Modalwert auf AM3 (0,032mg/l) 8 Konzentrationsstufen (= 4 geometrische Stufen) niedriger angesiedelt als der entsprechende Wert auf YST (0,38mg/l).

Die ermittelten MHK-Werte des Gesamtkollektivs wurden für weitere Analysen anhand der Breakpoints (Tab. M 07) in die Empfindlichkeitsklassen des S-I-R-Systems („Sensibel“, „Intermediär“ und „Resistent“) überführt (Tab. E 12b), um die „klinische“ Relevanz der Nährboden bedingten Empfindlichkeitsveränderungen näher zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass hinsichtlich des Gesamtkollektivs auf AM3 geringfügig mehr Hefen (5,1%) sensibel gegenüber Amphotericin B reagierten (95,8%) als auf YST (90,7%). Dies traf jedoch nicht für die *C. albicans* - Isolate zu, die sich auf beiden Medien gleichermaßen fast ausschließlich (98,9%) als sensibel erwiesen. Im Gegensatz dazu waren bei den non – *Candida* – Isolaten unter Verwendung des Nährmediums AM3 90,0% der Hefen sensibel, während auf YST nur 66,7% der Hefen sensibel gegenüber Amphotericin B reagierten. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden war ebenfalls ein Unterschied in der Empfindlichkeitsverteilung der Isolate des Gesamtkollektivs zwischen der Verwendung von AM3 und YST zu erkennen (Abb. E 05).

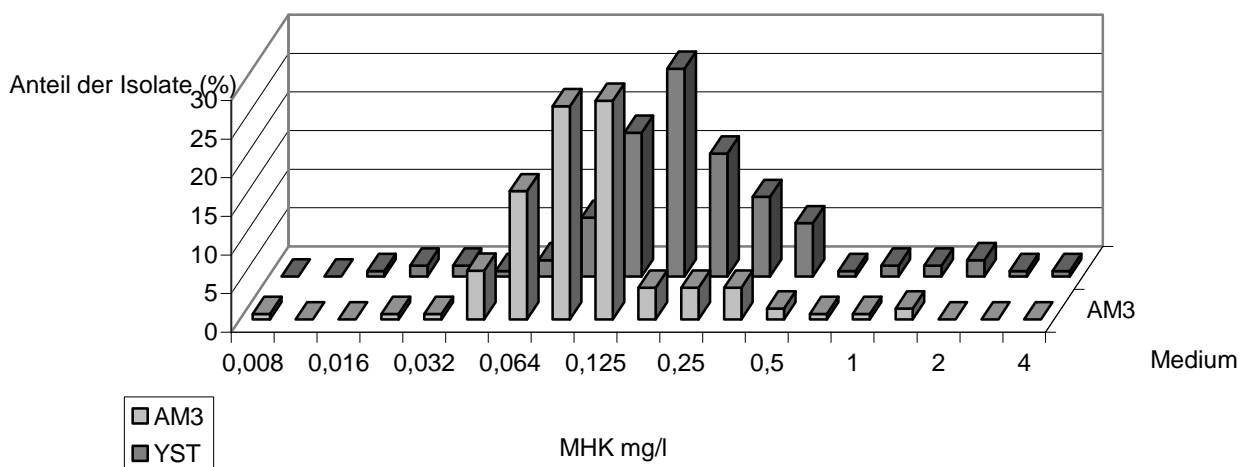


Abb. E 05: Empfindlichkeitsverteilung des Gesamtkollektivs gegenüber **Amphotericin B** in Abhängigkeit der unterschiedlichen Medien (AM3 und YST) nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden im E-Test

Auf AM3 lagen die Referenzwerte MHK50 und MHK90 zwei Konzentrationsstufen unter den entsprechenden Werten auf YST (Tab. E 13a). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass beim E-Test zwei Verdünnungsreihen ineinander griffen. Zwei Konzentrationsstufen im E-Test entsprachen also nur einer geometrischen Stufe, sodass diese Differenz im Schwankungsbereich der Methode lag.

Bei isolierter Betrachtung der einzelnen Subkollektive wurde deutlich, dass die non – *C. albicans* – Isolate und die non – *Candida* – Isolate auf den verschiedenen Medien meist unterschiedlicher reagierten, als die *C. albicans* – Isolate (Tab. E 13a; Tabellen-Anhang: E 13b): Bei den *C. albicans* – Isolaten lagen je zwei Konzentrationsstufen (= eine geometrische Stufe) zwischen den sich entsprechenden Referenzwerten auf den unterschiedlichen Medien, bei den anderen beiden Subkollektiven hingegen je nach Referenzwert zwischen ein und sieben (das entspricht ein bis vier geometrische Stufen).

Tab. E 13a: Verteilung der Referenzwerte gegenüber **Amphotericin B** in Abhängigkeit von den Nährmedien (AM3; YST) nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden im E-Test

Kollektiv	Medium	N	MHK50 (mg/l)	MHK90 (mg/l)	Mode (mg/l)	WT-UL (mg/l)
<i>C. albicans</i>	AM3	91	0,094	0,125	0,094	0,38
	YST	91	0,19	0,25	0,19	0,75
Non- <i>C. albicans</i>	AM3	43	0,125	0,5	0,064	0,5
	YST	43	0,38	2	0,38	1,5
Non - <i>Candida</i>	AM3	11	0,064	0,38	0,047; 0,38	0,25
	YST	11	0,38	1	0,5	1,5
Total	AM3	145	0,094	0,25	0,125	0,38
	YST	145	0,19	0,5	0,19	0,75

Die Klassifizierung der MHK-Werte in die Empfindlichkeitsklassen „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ (Tab. E 13b) zeigte, dass auf AM3 ein größerer Anteil der Isolate des Gesamtkollektivs (91,7%) sensibel auf Amphotericin B (APH) reagierte als auf YST (75,2%). Am deutlichsten prägte sich die Differenz im Subkollektiv der non – *C. albicans* – Hefen aus: Unter Verwendung des Mediums AM3 reagierten 81,4% der Isolate sensibel gegenüber APH, auf YST hingegen nur 37,2%. Die *C. albicans* – Isolate verhielten sich – wie schon nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden – auf beiden Medien nahezu identisch: Auf YST reagierten 96,7%, auf AM3 98,9% der Isolate sensibel gegenüber APH.

Eine Detailanalyse erfolgte mittels einer Isolat-bezogenen SIR-Empfindlichkeitsmusteranalyse (Tab. E 14a, E 14b)

Tabelle E 14a: Vergleich der Empfindlichkeiten der Hefen gegenüber **Amphotericin B** (APH) im E-Test in **YST** und **AM3** basierend auf der SIR-Einteilung (Inkubationszeit: 48 Std.)

Gruppe	N	YST=AM3		YST>AM3		AM3>YST	
		n	%	n	%	n	%
Calb	91	89	97,8	0	0,0	2	2,2
nCalb	43	22	51,2	0	0,0	21	48,9
nCan	11	8	72,8	0	0,0	3	27,3
Total	145	119	82,1	0	0,0	26	18,0

YST=AM3: Ergebnis in beiden Nährmedien gleich (Muster: SS; II; RR)

YST>AM3: Testergebnis auf YST sensibler als auf AM3 (Muster: SI; IR; SR)

AM3>RP-S: Testergebnis auf AM3 sensibler als auf YST (Muster: IS; RI; RS)

Diese Form der Analyse war möglich, da die MHK-Bestimmungen auf YST und AM3 aus demselben Inokulum erfolgt waren.

Bei keiner der 145 vergleichenden Testungen war das Testergebnis aus YST sensibler als auf AM3 (Tab E 14a; Spalte YST>AM3). Während eine Abweichung der Ergebnisse bei *C.albicans* nur 2,2 % der Paralleltestungen ausmachte, lag sie im Subkollektiv der non-*C.albicans*-Arten mit 21 von 43

(48,9%) Testungen und in der non-*Candida* Gruppe mit 3 von 11 (27,3%) Testungen deutlich höher.

Innerhalb dieser beiden Gruppen variierten die Ergebnisse artbezogen erheblich.

Bei einer Betrachtung mittels einer SIR-Empfindlichkeitsmusteranalyse ergaben sich zwei Abweichungsgrade: die minor-Differenzen und die major-Differenzen.

Bei den minor-Differenzen fand sich eine Abweichung um eine SIR-Kategorie (SI, IR, IS, RI), sie lagen somit im Schwankungsbereich der Methode.

Tabelle E 14b: Isolat-bezogene SIR-Empfindlichkeitsmuster-Analyse der Ergebnisse des E-Test auf YST (1. Buchstabe) und AM3 (2. Buchstabe) (Inkubationszeit: 48 Stunden)

N-Zahl-Tabelle	SIR-Empfindlichkeitsmuster						Total-N	Differenzen (n)			Differenzen (%)		
	II	IS	RI	RR	RS	SS		=100%	keine	minor	major	keine	minor
<i>C. albicans</i>	0	2	0	1	0	88	91	89	2	0	97,8	2,2	0
<i>C. dubliniensis</i>	0	1	0	0	0	3	4	3	1	0	75	25	0
<i>C. glabrata</i>	2	4	0	3	0	2	11	7	4	0	63,6	36,4	0
<i>C. kefyr</i>	1	2	0	0	0	0	3	1	2	0	33,3	66,7	0
<i>C. krusei</i>	0	0	2	0	2	0	4	0	2	2	0	50	50
<i>C. lusitaniae</i>	0	0	0	0	0	4	4	4	0	0	100	0	0
<i>C. norvegensis</i>	0	3	0	0	0	2	5	2	3	0	40	60	0
<i>C. parapsilosis</i>	0	2	0	0	0	3	5	3	2	0	60	40	0
<i>C. pelliculosa</i>	0	1	0	0	0	2	3	2	1	0	66,7	33,3	0
<i>C. tropicalis</i>	0	4	0	0	0	0	4	0	4	0	0	100	0
nCalb Ergebnis	3	17	2	3	2	16	43	22	19	2	51,2	44,2	4,7
<i>G. capitatum</i>	1	0	0	0	2	0	3	1	0	2	33,3	0	66,7
<i>R. mucilaginosa</i>	2	0	0	0	0	0	2	2	0	0	100	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	0	1	0	0	0	2	3	2	1	0	33,3	66,7	0
<i>Trich. mucoides</i>	0	0	0	0	0	3	3	3	0	0	100	0	0
nCan Ergebnis	3	1	0	0	2	5	11	8	1	2	72,7	9,1	18,2
Gesamtergebnis	6	20	2	4	4	109	145	119	22	4	82,1	15,2	2,8

Differenz: keine: SS; II; RR minor: SI; IS; IR; RI major: SR; RS

Bei den major-Differenzen wurde eine SIR-Kategorie übersprungen (SR, RS), sie lagen somit immer außerhalb der Schwankungsbreite der Methode. Solche major-Differenzen waren hier nur bei zwei der vier (50%) *C. krusei* - Isolate und bei zwei der drei (66,7%) *Geotrichum capitatum* – Isolate zu erkennen. In allen vier Fällen reagierten die Isolate auf YST resistent und auf AM3 sensibel (Tab. E 14b).

Sowohl bei der 24-Stunden- als auch bei der 48-Stunden-Auswertung war zu erkennen, dass sich die MHK-Werte unter Verwendung des Mediums AM3 stets über eine größere Konzentrationsspanne (=range) verteilten, als unter Verwendung von YST. Die Verwendung von AM3 hatte also eine größere Heterogenität bei den MHK-Werten zur Folge als die Verwendung von YST. Zwar hatte das Gesamtkollektiv nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden auf AM3 eine geringfügig größere Anzahl an auswertbaren Hefen als auf YST, die Subkollektive der *C. albicans* – Isolate waren jedoch mit 91 auswertbaren Hefen auf beiden Medien gleich groß und somit direkt vergleichbar: Unter Verwendung von YST verteilten sich die Werte der *C. albicans* – Isolate über eine Spanne von neun Konzentrationsstufen, unter Verwendung von AM3 hingegen über 27 Konzentrationsstufen (Tab. E 15). Diese Differenz zeigte sich nach 48 Stunden zwar ebenfalls, war jedoch nach der längeren Inkubationszeit deutlich kleiner.

Tab. E 15: Breite der Konzentrationsspektren beim E-Test unter Verwendung der Medien YST und AM3

Kollektiv	Medium	24 Stunden			48 Stunden		
		range (mg/l)	Konzentrationsstufen	n	range (mg/l)	Konzentrationsstufen	n
Total	YST	0,012 - 1,5	14	140	0,016 - >32	23	145
<i>C. albicans</i>		0,023 - 0,5	9	91	0,032 - >32	21	91
non <i>C. albicans</i> (nCalb)		0,023 - 1,5	12	40	0,023 - 8	17	43
non <i>Candida</i> (nCan)		0,012 - 0,5	11	9	0,016 - 1,5	13	11
Total	AM3	<0,002 - >32	30	143	<0,002 - >32	30	145
<i>C. albicans</i>		0,004 - >32	27	91	0,008 - >32	25	91
non <i>C. albicans</i> (nCalb)		<0,002 - 1,5	20	42	<0,002 - 2	21	43
non <i>Candida</i> (nCan)		<0,002 - 0,5	17	10	<0,002 - 0,38	16	11

3.2.2 Einflussnahme auf die Empfindlichkeitsverteilung unter Verwendung der Nährmedien YST, RPMI-E, RPMI-S und RPMI-MB

3.2.2.1 gegenüber Amphotericin B im E-Test

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden modellhaft mit 59 Hefe-Isolaten durchgeführt, die in den Voruntersuchungen ein verlässliches Wachstum gezeigt hatten. Das Spektrum der Arten geht aus Tab. E 18 hervor.

Zum Vergleich der vier Medien (RPMI-E, RPMI-MB, RPMI-S, YST) wurde die Empfindlichkeitsverteilung des Gesamtkollektivs an Hefen gegenüber Amphotericin B untersucht. Aus der Untersuchung der Medien im E-Test nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ging hervor, dass sich die Empfindlichkeiten der Hefen gegenüber Amphotericin B auf den verschiedenen RPMI-Medien nur geringfügig unterschieden (Tab. E 16a; Tabellen-Anhang: E 16b): Der Referenzwert MHK₅₀ lag bei diesen drei Medien gleichermaßen bei 0,032mg/l, zwischen den anderen untersuchten Referenzwerten lag auf den drei verschiedenen RPMI-Medien jeweils nur eine Differenz von einer Konzentrationsstufe. Unter Verwendung von YST lag der MHK₅₀-Wert zwei Konzentrationsstufen (= eine geometrische Stufe) höher als auf den RPMI-Medien, nämlich bei 0,064mg/l. Auch der Referenzwert MHK₉₀ war unter Verwendung von YST höher angesiedelt als bei den drei anderen Medien.

Tab. E 16a: Verteilung der Referenzwerte gegenüber **Amphotericin B** in Abhängigkeit der Nährmedien (RPMI-E, RPMI-S RPMI-MB, YST) beim E-Test (Inkubationszeit: 24 Std.)

Medium	N	MHK ₅₀ (mg/l)	MHK ₉₀ (mg/l)	Mode (mg/l)	Range (mg/l)	WT-UL (mg/l)
RPMI-E	59	0,032	0,125	0,032	0,008 – 0,38	0,125
RPMI-S	59	0,032	0,094	0,032	0,008 – 1	0,125
RPMI-MB	59	0,032	0,094	0,023	0,006 – 0,38	0,125
YST	59	0,064	0,25	0,064	0,006 – 2	0,25

Hinsichtlich der Einteilung in die Empfindlichkeitsklassen „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ zeigte sich, dass über 90% der untersuchten Hefen auf allen vier Medien sensibel gegenüber Amphotericin B (APH) reagierten (Tab. E 16b). Nur vereinzelte Hefen verhielten sich intermediär oder resistent.

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden lagen die Referenzwerte für die Empfindlichkeitsverteilung des Gesamtkollektivs gegenüber Amphotericin B auf den unterschiedlichen Nährmedien weniger dicht beieinander als nach 24 Stunden (Tab. E 17a, Tabellenanhang: E 17b): So wurde z.B. der niedrigste MHK50-Wert mit 0,064mg/l unter Verwendung von RPMI-E ermittelt, während der höchste MHK50-Wert mit 0,19mg/l (also drei E-Test-Stufen höher) auf YST vorkam. Auf dem Yeast-Susceptibility-Testmedium zeigte das Gesamtkollektiv also – wie bereits nach 24 Stunden - wiederum die geringste Empfindlichkeit gegenüber Amphotericin B. Die Differenz im Vergleich zu den anderen Nährmedien erwies sich jedoch als gering und lag meist im Schwankungsbereich der Methode.

Tab. E 17a: Verteilung der Referenzwerte gegenüber **Amphotericin B** in Abhängigkeit der Nährmedien (RPMI-E, RPMI-MB, RPMI-S, YST) im E-Test (Inkubationszeit: 48 Std.)

Medium	N	MHK50 (mg/l)	MHK90 (mg/l)	Mode (mg/l)	Range (mg/l)	WT-UL (mg/l)
RPMI-E	59	0,064	0,25	0,047; 0,064	0,008 – 1,5	0,125
RPMI-MB	59	0,125	0,38	0,125	0,016 – 4	0,5
RPMI-S	59	0,094	0,125	0,094	0,016 – 1	0,38
YST	60	0,19	0,5	0,125	0,023 – 3	0,75

Eine Analyse der Empfindlichkeitsverteilungen mittels der S-I-R Klassifizierung zeigte hingegen deutlichere Unterschiede: Während unter Verwendung von RPMI-S 98,3% der Isolate des Gesamtkollektivs sensibel gegenüber Amphotericin B reagierten, verhielten sich unter Verwendung von YST nur

81,3% der Isolate sensibel (Tab. E 17b). Auch bei dieser Untersuchung spiegelte sich also wider, dass YST das Medium war, auf dem die Hefen im Vergleich zu den anderen Nährböden die höchsten MHK-Werte zeigten.

Für eine weiterführende Detailanalyse mittels der Empfindlichkeitsmuster-Analyse wurden die SIR-Ergebnisse der Paralleltestungen auf YST und RPMI-E für jedes Isolat zu einem Muster zusammengefasst und die Häufigkeit der sich ergebenden Muster ermittelt. Dabei wurde deutlich, dass 95,5% der *C. albicans*-Isolate und 100% der non-*Candida*-Isolate sowohl auf YST als auch auf RPMI-E sensibel reagierten (Tab. E 18). Neben den übrigen beiden *C. albicans*-Isolaten zeigten nur die zwei *C. norvegensis*-Stämme und je ein *C. parapsilosis*- und *C. tropicalis*-Stamm minor-Differenzen. Dabei reagierten *C. norvegensis*, der *C. tropicalis*- und die beiden *C. albicans*-Isolate auf RPMI-E, *C. parapsilosis* hingegen auf YST empfindlicher. Major-Differenzen ergaben sich bei dieser Analyse nicht.

Tab. E 18: Isolat-bezogene SIR-Empfindlichkeitsmuster-Analyse bei Paralleltestung gegenüber **Amphotericin B** mittels **E-Test** aus demselben Isolat auf verschiedenen Nährböden: YST (1. Buchstabe); RPMI-E (2. Buchstabe) (Inkubationszeit: 48 Stunden)

N-Zahl-Tabelle	Empfindlichkeitsmuster YST vs.					Total	Differenzen (n)			Differenzen (%)		
	II	IR	IS	RR	SS		keine	minor	major	keine	minor	major
<i>C. albicans</i>			2		42	44	42	2	0	95,5	4,5	0
<i>C. dubliniensis</i>					2	2	2	0	0	100	0	0
<i>C. kefyr</i>					1	1	1	0	0	100	0	0
<i>C. krusei</i>				1		1	1	0	0	100	0	0
<i>C. norvegensis</i>			2			2	0	2	0	0	100	0
<i>C. parapsilosis</i>		1				1	0	1	0	0	100	0
<i>C. pelliculosa</i>					2	2	2	0	0	100	0	0
<i>C. tropicalis</i>	2		1			3	2	1	0	66,7	33,3	0
nCalb Ergebnis	2	1	3	1	5	12	8	4	0	66,7	33,3	0
<i>T. mucooides</i>				1	1	2	2	0	0	100	0	0
Total	2	1	5	2	48	58	52	7	0	89,6	10,3	0

Differenzen: keine: SS; II; RR minor: SI; IS; IR;RI major: SR; RS

3.2.2.2 Einflussnahme auf die Empfindlichkeitsverteilung unter Verwendung der Nährmedien YST, RPMI-E, RPMI-S und RPMI-MB gegenüber Amphotericin B und Fluconazol im Mikrodilutionstest

Parallel zum E-Test wurde die Empfindlichkeitsverteilung im Mikrodilutionstest gegen Amphotericin B und vergleichend gegen Fluconazol unter Verwendung der vier Nährmedien RPMI-E, RPMI-MB, RPMI-S und YST untersucht.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ergaben sich gegenüber **Amphotericin B** bei Verwendung von YST für die MHK-Werte – und damit auch für die Referenzwerte – höhere Konzentrationen als auf den anderen Medien (Tab. E 19a; Tabellen-Anhang: E 19b): Die Referenzwerte MHK₅₀, MHK₉₀ und Mode lagen allesamt bei einer Konzentration von 1mg/l, also in dem als resistent definierten Bereich. Unter Verwendung von RPMI-S zeigten die untersuchten Hefen die im Vergleich zu den anderen Medien größte Empfindlichkeit: MHK₅₀ und Mode lagen mit 0,25mg/l im sensiblen Bereich (und damit zwei Konzentrationsstufen unter dem entsprechenden Wert in YST), MHK₉₀ bei 0,5mg/l, also im als intermediär eingestuften Bereich.

Gegenüber **Fluconazol** hingegen lagen MHK₅₀ und der Modalwert bei Verwendung der Medien YST, RPMI-E und RPMI-MB bei einer Konzentration von 1mg/l (=sensibel), während die entsprechenden Werte bei Verwendung von RPMI-S eine geometrische Konzentrationsstufe höher, bei 2mg/l angesiedelt waren. MHK₉₀ lag in RPMI-S und RPMI-E sogar drei Stufen höher (64mg/l = resistent) als in RPMI-MB und YST (Tab. E 19a, Tabellen-Anhang: E 19c). Das wild Typ upper limit (WT-UL) lag gegenüber Amphotericin B in allen Medien bei resistenten, gegenüber Fluconazol hingegen bei sensiblen Konzentrationen.

Tab. E 19a: Verteilung der Referenzwerte im Mikrodilutionstest gegenüber **Amphotericin B** (APH) und **Fluconazol** (FCA) in Abhängigkeit von den Nährmedien (RPMI-E, RPMI-S, RPMI-MB, YST) (Inkubationszeit: 24 Std.)

Antimykotikum	Medium	N	MHK50	MHK90	Mode (mg/l)	range (mg/l)	WT-UL
APH	RPMI-E	58	0,5	1	0,5	0,063 – 1	2
	RPMI-S	56	0,25	0,5	0,25	0,25 – 1	1
	RPMI-MB	58	0,5	1	0,5	0,25 – 2	2
	YST	58	1	1	1	0,5 – 2	4
FCA	RPMI-E	58	1	64	1	0,063 – >128	4
	RPMI-S	56	2	64	2	1 – >128	8
	RPMI-MB	58	1	8	1	1 – 64	4
	YST	58	1	8	1	1 – 64	4

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden fielen die MHK-Werte – und somit auch die Referenzwerte – der getesteten Hefen gegenüber **Amphotericin B** auf den Nährmedien YST, RPMI-E und RPMI-MB gleichermaßen hoch aus (Tab. E 20a, Tabellen-Anhang: E 20b).

Tab. E 20a: Verteilung der Referenzwerte im Mikrodilutionstest gegenüber **Amphotericin B** (APH) und **Fluconazol** (FCA) in Abhängigkeit von den Nährmedien (RPMI-E, RPMI-S, RPMI-MB, YST) (Inkubationszeit: 48 Std.)

Antimykotikum	Medium	N	MHK50	MHK90	Mode (mg/l)	range	WT-UL
APH	RPMI-E	58	1	2	1	0,125 – 2	4
	RPMI-S	58	0,5	0,5	0,5	0,25 – 1	2
	RPMI-MB	58	1	2	1	0,25 – 2	4
	YST	59	1	2	1	0,25 – 4	4
FCA	RPMI-E	58	1	>128	1	1 – >128	4
	RPMI-S	57	16	>128	>128	1 – >128	64
	RPMI-MB	58	1	32	1	1 – >128	4
	YST	59	1	16	1	1 – 128	4

Sämtliche ermittelten Referenzwerte lagen bei diesen drei Medien in dem als resistent definierten Bereich (zwischen 1mg/l und 4mg/l) (Tab. E 20b). Unter Verwendung des Mediums RPMI-S lagen MHK50, MHK90 und der Modalwert

hingegen bei einer Konzentration von 0,5mg/l und damit im intermediären Bereich.

Gegenüber **Fluconazol** lagen MHK₅₀, Mode und der WT-UL in RPMI-S mindestens vier geometrische Stufen über den in den anderen Medien ermittelten Werten. Während der Modalwert in RPMI-E, RPMI-MB und YST weit im sensiblen Konzentrationsbereich lag (1mg/l), war er in RPMI-S mit >128mg/l im resistenten Bereich angesiedelt (Tab. E 20a, Tabellen-Anhang: E 20c).

In der Isolat-bezogenen SIR-Empfindlichkeitsmuster-Analyse der parallelen Mikrodilutionstests in YST und RPMI-E bei Verwendung von **Amphotericin B** fand sich, dass bei insgesamt vier der 58 Isolate (6,9%) eine major-Differenz zwischen den auf den beiden Medien ermittelten Ergebnissen vorlag (Tab. E 21a). Bei den Isolaten handelte es sich um einen der beiden *C. pelliculosa*- und zwei *C. albicans*-Stämme. Alle drei Isolate verhielten sich im RPMI-Medium signifikant sensibler als in YST. Ein anderes *C. albicans*-Isolat reagierte in YST deutlich empfindlicher. Insgesamt lag der Anteil der in beiden Medien gleich reagierenden *C. albicans*-Isolate im Mikrodilutionstest mit 68,2% deutlich unter dem im E-Test (95,5%).

In der Isolat-bezogenen SIR-Empfindlichkeitsmuster-Analyse bei Verwendung von **Fluconazol** zeigten sogar 15 der 58 Isolate (25,9%) eine major-Differenz, wobei alle in YST resistent und in RPMI-E sensibel reagierten (Tab. E 21b). Bei den 15 Isolaten handelte es sich um 14 *C. albicans*-Stämme und einen *C. tropicalis*-Stamm. Wie schon bei der Analyse des Mikrodilutionstests mit Amphotericin B lag auch hier der Anteil an Isolaten, die in beiden Medien gleich reagierten, insgesamt nur bei gut zwei Dritteln (67,2%).

Die Empfindlichkeiten einzelner Isolate wurde also beeinflusst vom Nährmedium und von der Tatsache, ob die Testung auf einem Nährboden stattfand (E-Test) oder in einer Nährbouillon (Mikrodilutionstest).

Tab. E 21: Isolat-bezogene SIR-Empfindlichkeitsmuster-Analyse bei Paralleltestung mittels **Mikrodilutionstest** aus demselben Isolat auf verschiedenen Nährböden: YST (1. Buchstabe); RPMI-E (2. Buchstabe) (Inkubationszeit: 48 Stunden)

a) gegenüber **Amphotericin B**

N-Zahl-Tabelle	Empfindlichkeitsmuster YST vs.							Differenzen (n)			Differenzen (%)				
	Genus	Spezies	II	IR	RI	RR	RS	SR	Total	keine	minor	major	keine	minor	major
	<i>C. albicans</i>		3	2	9	27	2	1	44	30	11	3	68,2	25	6,8
	<i>C. dubliniensis</i>				1	1			2	1	1	0	50	50	0
	<i>C. kefyr</i>					1			1	1	0	0	100	0	0
	<i>C. krusei</i>					1			1	1	0	0	100	0	0
	<i>C. norvegensis</i>					2			2	2	0	0	100	0	0
	<i>C. parapsilosis</i>					1			1	1	0	0	100	0	0
	<i>C. pelliculosa</i>		1				1		2	1	0	1	50	0	50
	<i>C. tropicalis</i>					3			3	3	0	0	100	0	0
	nCalb-Ergebnis		1		1	9	1		12	10	1	1	83,3	8,3	8,3
	<i>T. mucoides</i>					2			2	2	0	0	100	0	0
	Total		4	2	10	38	3	1	58	42	12	4	72,4	20,6	6,9

Differenzen: keine: SS; II; RR minor: SI; IS; IR; RI major: SR; RS

b) gegenüber **Fluconazol**

N-Zahl-Tabelle	Empfindlichkeitsmuster YST vs.							Differenzen (n)			Differenzen (%)					
	Genus	Spezies	II	IS	RR	SI	SR	SS	Total	keine	minor	major	keine	minor	major	
	<i>C. albicans</i>			1				14	29	44	29	1	14	65,9	2,3	31,8
	<i>C. dubliniensis</i>					1		1	2	2	1	1	0	50	50	0
	<i>C. kefyr</i>							1	1	1	0	0	100	0	0	
	<i>C. krusei</i>				1				1	1	0	0	100	0	0	
	<i>C. norvegensis</i>		1		1				2	2	0	0	100	0	0	
	<i>C. parapsilosis</i>							1	1	1	0	0	100	0	0	
	<i>C. pelliculosa</i>			2					2	2	0	2	0	100	0	
	<i>C. tropicalis</i>						1	2	3	2	0	1	66,7	0	33,3	
	nCalb-Ergebnis		1	2	2	1	1	5	12	8	3	1	66,7	25	8,3	
	<i>T. mucoides</i>							2	2	2	0	0	100	0	0	
	Total		1	3	2	1	15	36	58	39	4	15	67,2	6,9	25,9	

Differenzen: keine: SS; II; RR minor: SI; IS; IR; RI major: SR; RS

Das Testergebnis eines einzelnen Isolates gegenüber Amphotericin B kann somit sowohl durch die Methode als auch durch das Testmedium beeinflusst werden.

Aufgrund dieses Ergebnisses stellte sich die Frage nach den wesentlichen Faktoren und dem Ausmaß der durch sie hervorgerufenen Beeinflussung.

Betrachtet man die Zusammensetzung der untersuchten Nährmedien, so lassen sich drei wesentliche Komponenten aufzeigen, in denen sie sich unterscheiden: das Basismedium, das Puffersystem sowie der Methylenblau-Zusatz.

3.2.3 Einfluss der Nährmedien: Faktorenanalyse im Mikrodilutionstest gegenüber Amphotericin B und Fluconazol

Die Analyse des Einflusses dieser Komponenten erfolgte durch einen Vergleich der Empfindlichkeitsdaten von je zwei Nährmedien, bei denen die gesuchte Komponente die einzige Variante war. Hierfür ergaben sich die folgenden Vergleiche:

Vergleich der Basisnährböden RPMI und YST:

RPMI-S vs. YST

Vergleich der Puffersysteme MOPS-Puffer und Phosphatpuffer nach Sørensen:

RPMI-MB vs. RPMI-S

Einfluß des Methylenblau-Zusatzes:

RPMI-E vs. RPMI-MB

3.2.3.1 Einfluss des Basisnährbodens (RPMI-S vs. YST)

RPMI-S ist ein mit Methylenblau und Phosphatpuffer nach Sørensen versetztes RPMI-Medium. YST, ein modifiziertes HR-Medium, enthält die gleiche Konzentration Methylenblau und den gleichen Phosphatpuffer wie RPMI-S, sodass die einzige Differenz im Basismedium liegt. Bezogen auf das

Gesamtkollektiv verhielten sich 87,9% der Isolate in YST resistent, in RPMI-S hingegen nur 5,2% (Tab. E 22). 50 der 58 Isolate reagierten in RPMI-S sensibler auf **Amphotericin B** als in YST (Tab. E 23). Das RPMI-Medium erzielte also in dieser Mikrodilutionstestung höhere Empfindlichkeiten der *Candida*-Isolate gegenüber APH als YST.

Gegenüber **Fluconazol** verhielten sich dieselben Isolate völlig anders: Bezogen auf das Gesamtkollektiv zeigte sich, dass in YST mehr als doppelt so viele Isolate sensibel gegenüber FCA reagierten, wie in RPMI-S (Tab. E 22). Rund die Hälfte der *Hefen* (49,1%) reagierte in YST sensibler als in RPMI-S, die andere Hälfte verhielt sich in beiden Medien gleich (Tab. E 23).

Tab. E 22: Vergleich der SIR-Verteilung des Gesamtkollektivs gegenüber Amphotericin B (APH) bzw. Fluconazol (FCA) in YST und RPMI-S im Mikrodilutionstest (Inkubationszeit: 48 Std.)

Antimykotikum	Nährboden	S	I	R	Total N	S	I	R	Total %
APH	YST	1	6	51	58	1,7	10,3	87,9	100
	RPMI-S	17	38	3	58	29,3	65,5	5,2	100
	Differenz	-16	-32	48	0	-27,6	-55,2	82,7	0
FCA	YST	51	4	2	57	89,5	7	3,5	100
	RPMI-S	24	9	24	57	42,1	15,8	42,1	100
	Differenz	27	-5	-22	0	47,4	-8,8	-38,6	0

Tabelle E 23: Vergleich der Empfindlichkeiten der Hefen gegenüber **Amphotericin B** (APH) bzw. **Fluconazol** (FCA) im Mikrodilutionstest in **RPMI-S** und **YST** basierend auf der SIR-Einteilung (Inkubationszeit: 48 Std.)

Antimykotikum	Gruppe	N	RP-S=YST		RP-S>YST		YST>RP-S	
			n	%	n	%	n	%
APH	Calb	44	5	11,4	38	86,4	1	2,3
	nCalb	12	1	8,3	11	91,7	0	0
	nCan	2	1	50	1	50	0	0
	Total	58	7	12,1	50	86,2	1	1,7
FCA	Calb	43	21	48,8	0	0	22	51,2
	nCalb	12	7	58,3	0	0	5	41,7
	nCan	2	1	50	0	0	1	50
	Total	57	29	50,9	0	0	28	49,1

RP-S=YST: Ergebnis in beiden Nährmedien gleich (Muster: SS; II; RR)

RP-S>YST: Testergebnis in RP-S sensibler als in YST (Muster: SI; IR; SR)

YST>RP-S: Testergebnis in YST sensibler als in RP-S (Muster: IS; RI; RS)

Die Unterteilung in minor- und major-Differenzen zeigte, dass gegenüber **Amphotericin B** bei den non-*C. albicans*-Isolaten der Anteil der major-Differenzen mit 50% (sechs von zwölf) doppelt so hoch lag, wie bei den *C. albicans* Isolaten (elf von 44 Isolaten, das entspricht 25%) (Tab. E 24a).

In 16 der 17 major-Differenzen waren die Isolate in RPMI-S sensibel und in YST resistent (SR). Innerhalb der Gruppe der non-*C. albicans*-Isolate zeigten sich artabhängige Unterschiede.

Gegenüber **Fluconazol** hingegen traten in der Gruppe der *C. albicans*-Isolate mit 46,5% aller Isolate häufiger major-Differenzen auf als unter den non-*C. albicans*-Isolaten (8,3%) (Tab. E 24b). In allen 21 major-Differenzen reagierten die Isolate in RPMI-S resistent und in YST sensibel. Das Ergebnis ist somit genau umgekehrt zu dem gegenüber Amphotericin B.

Tab. E 24: Isolat-bezogene SIR-Empfindlichkeitsmuster-Analyse der Ergebnisse des Mikrodilutionstests im Nährmedium mit **RPMI** als Basis (RPMI-S) und im Nährmedium mit **YST** als Basis (YST). Empfindlichkeitsmuster: RPMI-S (1. Buchstabe) ; YST (2. Buchstabe) Inkubationszeit: 48 Stunden

a) gegenüber **Amphotericin B**

N-Zahl-Tabelle	Empfindlichkeitsmuster (n)						Total-N =100%	Differenzen (n)			Differenzen (%)		
	SI	SR	II	IR	RS	RR		keine	minor	major	keine	minor	major
<i>C. albicans</i>		10	5	28	1		44	5	28	11	11,4	63,6	25
<i>C. dubliniensis</i>		2					2	0	0	2	0	0	100
<i>C. kefyr</i>		1					1	0	0	1	0	0	100
<i>C. krusei</i>						1	1	1	0	0	100	0	0
<i>C. norvegensis</i>		2					2	0	0	2	0	0	100
<i>C. parapsilosis</i>				1			1	0	1	0	0	100	0
<i>C. pelliculosa</i>	1	1					2	0	1	1	0	50	50
<i>C. tropicalis</i>				3			3	0	3	0	0	100	0
nCalb	1	6		4		1	12	1	5	6	8,3	41,7	50
<i>T. mucoides</i>				1		1	2	1	1	0	50	50	0
Total	1	16	5	33	1	2	58	7	34	17	12,1	58,6	29,3

Differenz: keine: SS; II; RR minor: SI; IS; IR;RI major: SR; RS

b) gegenüber **Fluconazol**

N-Zahl-Tabelle	Empfindlichkeitsmuster (n)						Total-N =100%	Differenzen (n)			Differenzen (%)		
	II	IS	RI	RR	RS	SS		keine	minor	major	keine	minor	major
<i>C. albicans</i>	1	2			20	20	43	21	2	20	48,8	4,7	46,5
<i>C. dubliniensis</i>		1			1		2	0	1	1	0,0	50,0	50,0
<i>C. kefyr</i>						1	1	1	0	0	100,0	0,0	0,0
<i>C. krusei</i>				1			1	1	0	0	100,0	0,0	0,0
<i>C. norvegensis</i>			1	1			2	1	1	0	50,0	50,0	0,0
<i>C. parapsilosis</i>		1					1	0	1	0	0,0	100,0	0,0
<i>C. pelliculosa</i>	2						2	2	0	0	100,0	0,0	0,0
<i>C. tropicalis</i>		1				2	3	2	1	0	66,7	33,3	0,0
nCalb	2	3	1	2	1	3	12	7	4	1	58,3	33,3	8,3
<i>T. mucoides</i>		1				1	2	1	1	0	50,0	50,0	0,0
Total	3	6	1	2	21	24	57	29	7	21	50,9	12,3	36,8

Differenz: keine: SS; II; RR minor: SI; IS; IR;RI major: SR; RS

3.2.3.2 Einfluss des Puffersystems (RPMI-S vs. RPMI-MB)

Während das Medium RPMI-MB mit MOPS (3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid) – Puffer gepuffert ist, liegt bei RPMI-S ein Phosphatpuffer nach Sørensen vor. Ansonsten sind die beiden Nährmedien identisch (einschließlich des Zusatzes von 0,5mg/L Methyleneblau). Der Einfluss des jeweiligen Puffersystems wurde folglich anhand der in diesen beiden Medien erhobenen SIR-Ergebnisse untersucht (Tab. E 25).

Im Vergleich der SIR-Verteilung des Gesamtkollektivs zeigte sich, dass bei Zugabe des MOPS-Puffers, also in RPMI-MB, 86,2% mehr Isolate resistent reagierten, als mit Phosphatpuffer (RPMI-S) (Tab. E 25). Rund 90% der *Candida*-Isolate verhielten sich gegenüber **Amphotericin B** in RPMI-S und somit bei Verwendung von Phosphatpuffer, sensibler als in RPMI-MB (Tab. E 26). Von den beiden *T. mucoides* – Isolaten (nCan) reagierte eines in beiden Medien identisch, das andere ebenfalls in RPMI-S sensibler.

Gegenüber **Fluconazol** verhielten sich in RPMI-MB, also in dem Medium mit MOPS-Puffer, fast doppelt so viele Isolate des Gesamtkollektivs sensibel, wie in RPMI-S (Tab. E 25). Jeweils rund die Hälfte der *C. albicans*-Isolate reagierten in beiden Medien gleich, bzw. in RPMI-MB sensibler (Tab. E 26). Von den non-*C. albicans*-Isolaten reagierten zwei Drittel in beiden Medien gleich, also unabhängig vom Puffersystem.

Tab. E 25: Vergleich der SIR-Verteilung des Gesamtkollektivs auf RPMI-MB und RPMI-S im Mikrodilutionstest (Inkubationszeit: 48 Std.)

Antimykotikum	Nährboden	S	I	R	Total N	S	I	R	Total %
APH	RPMI-MB	1	4	53	58	1,7	6,9	91,4	100
	RPMI-S	17	38	3	58	29,3	65,5	5,2	100
	Differenz	-16	-34	50	0	-27,6	-58,6	86,2	0
FCA	RPMI-MB	47	5	5	57	82,5	8,8	8,8	100
	RPMI-S	24	9	24	57	42,1	15,8	42,1	100
	Differenz	23	-4	-19	0	40,4	-7	-33,3	0

Tabelle E 26: Vergleich der Empfindlichkeiten der Hefen gegenüber APH, bzw. FCA im Mikrodilutionstest in **RPMI-MB** und **RPMI-S** basierend auf der SIR-Einteilung (Inkubationszeit: 48 Std.)

Antimykotikum	Gruppe	N	RP-MB=RP-S		RP-MB>RP-S		RP-S>RP-MB	
			n	%	n	%	n	%
APH	Calb	44	5	11,4	0	0	39	88,6
	nCalb	12	1	8,3	0	0	11	91,7
	nCan	2	1	50	0	0	1	50
	Total	58	7	12,1	0	0	51	87,9
FCA	Calb	43	20	46,5	22	51,2	1	2,3
	nCalb	12	8	66,7	3	25	1	8,3
	nCan	2	1	50	1	50	0	0
	Total	57	29	50,9	26	45,6	2	3,5

RP-MB=RP-S: Ergebnis in beiden Nährmedien gleich (Muster: SS; II; RR)

RP-MB>RP-S: Testergebnis in RP-MB sensibler als in RP-S (Muster: SI; IR; SR)

RP-S>RP-MB: Testergebnis in RP-S sensibler als in RP-MB (Muster: IS; RI; RS)

Eine Unterteilung in die einzelnen Empfindlichkeitsmuster und in major- und minor-Differenzen verdeutlichte, dass gegenüber **Amphotericin B** bei etwa einem Viertel (25,9%) aller Isolate major-Differenzen vorlagen (Tab. E 27a). Dabei war in allen Fällen das Ergebnis in RPMI-S sensibel und in RPMI-MB resistent. Jedoch variierte der Anteil der major-Differenzen in Abhängigkeit von der *Candida*-Art: Bei rund 70 % der *C.albicans*-Isolate lag eine minor-Differenz vor, so dass nur 18,2% der *C.albicans* Stämme einen relevanten Empfindlichkeitsunterschied aufwiesen. In der Gruppe der non - *C.albicans*-Isolate wies das Bild im Vergleich zur vorherigen Analyse eine gewisse Ähnlichkeit auf: So waren es wieder *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. norwegensis* und *C. pelliculosa* bei denen major-Differenzen vorlagen. *C.krusei* blieb unabhängig vom Nährmedium resistent. Ebenso blieb eines der beiden *Trichosporum mucoides*-Isolate (MY 1365 II) unabhängig vom Puffersystem. Der zweite Stamm (M 4853 II) zeigte auch hier eine minor-Differenz (RI).

Gegenüber **Fluconazol** lagen bei 44,2% der *C. albicans*-Isolate major Differenzen vor, wobei 18 dieser 19 Isolate in RPMI-MB sensibel und in RPMI-S resistent reagierten. Die *C. albicans*-Isolate verhielten sich unter Zugabe von MOPS-Puffer also häufig deutlich empfindlicher gegenüber Fluconazol als mit

Phosphatpuffer (Tab. E 27b). Darüber hinaus zeigte ein *C. dubliniensis* – Isolat (MY 2815) eine major-Differenz (während das andere in beiden Nährmedien identisch reagierte): Auch dieses Isolat verhielt sich bei Zugabe von MOPS-Puffer sensibel, während es in RPMI-S resistent reagierte.

Ähnlich wie schon bei der Untersuchung der Basismedien sind auch die Ergebnisse gegenüber den beiden Antimykotika konträr.

Tab. E 27: Isolat-bezogene SIR-Empfindlichkeitsmuster-Analyse der Ergebnisse des Mikrodilutionstests im Nährmedium mit **MOPS-Puffer** (RPMI-MB) und im Nährmedium mit **Phosphatpuffer nach Sørensen** (RPMI-S) Empfindlichkeitsmuster: RPMI-MB (1. Buchstabe); RPMI-S (2. Buchstabe) Inkubationszeit: 48 Stunden

a) gegenüber **Amphotericin B**

N-Zahl-Tabelle	Empfindlichkeitsmuster (n)						Total-N =100%	Differenzen (n)			Differenzen (%)		
	SS	IS	II	RI	RS	RR		keine	minor	major	keine	minor	major
<i>C. albicans</i>	1	1	3	30	8	1	44	5	31	8	11,4	70,5	18,2
<i>C. dubliniensis</i>					2		2	0	0	2	0	0	100
<i>C. kefyr</i>					1		1	0	0	1	0	0	100
<i>C. krusei</i>						1	1	1	0	0	100	0	0
<i>C. norvegensis</i>					2		2	0	0	2	0	0	100
<i>C. parapsilosis</i>				1			1	0	1	0	0	100	0
<i>C. pelliculosa</i>					2		2	0	0	2	0	0	100
<i>C. tropicalis</i>				3			3	0	3	0	0	100	0
nCalb				4	7	1	12	1	4	7	8,3	33,3	58,3
<i>T. mucoides</i>				1		1	2	1	1	0	50	50	0
Total	1	1	3	35	15	3	58	7	36	15	12,1	62,1	25,9

Differenz: keine: SS; II; RR minor: SI; IS; IR; RI major: SR; RS

b) gegenüber **Fluconazol**

N-Zahl-Tabelle	Empfindlichkeitsmuster (n)								Total-N N=100%	Differenzen (n)			Differenzen (%)		
	II	IR	RI	RR	RS	SI	SR	SS		keine	minor	major	keine	minor	major
<i>C. albicans</i>		1		1	1	3	18	19	43	20	4	19	46,5	9,3	44,2
<i>C. dubliniensis</i>	1						1		2	1	0	1	50,0	0,0	50,0
<i>C. kefyr</i>								1	1	1	0	0	100,0	0,0	0,0
<i>C. krusei</i>				1					1	1	0	0	100,0	0,0	0,0
<i>C. norvegensis</i>		1		1					2	1	1	0	50,0	50,0	0,0
<i>C. parapsilosis</i>						1			1	0	1	0	0,0	100,0	0,0
<i>C. pelliculosa</i>	2								2	2	0	0	100,0	0,0	0,0
<i>C. tropicalis</i>			1					2	3	2	1	0	66,7	33,3	0,0
nCalb	3	1	1	2		1	1	3	12	8	3	1	66,7	25,0	8,3
<i>T. mucoides</i>						1		1	2	1	1	0	50,0	50,0	0,0
Total	3	2	1	3	1	5	19	23	57	29	8	20	50,9	14,0	35,1

Differenz: keine: SS; II; RR minor: SI; IS; IR;RI major: SR; RS

3.2.3.3 Einfluss von Methyleneblau (RPMI-E vs.RPMI-MB)

Um zu untersuchen, ob die Zugabe von Methyleneblau im Mikrodilutionstest von *Candida*-Hefen gegenüber APH von Vorteil ist, wurden die RPMI-Medien RPMI-E (ohne Methyleneblau) und RPMI-MB (mit Methyleneblau) zum Vergleich herangezogen.

Im Vergleich der SIR-Verteilung des Gesamtkollektivs zeigte sich, dass bei Zugabe von Methyleneblau, also in RPMI-MB, rund 20% mehr Resistenzen auftraten, als ohne Methyleneblau (RPMI-E) (Tab. E 28). Bei Unterteilung in die Subkollektive fand sich, dass die überwiegenden Teile aller drei Isolat-Gruppen in RPMI-E und RPMI-MB gleich sensibel gegenüber **Amphotericin B** reagierten (Tab. E 29). Ein Viertel der untersuchten *Candida* – Isolate reagierte jedoch sensibler in RPMI-E, welches den Methyleneblau-Zusatz nicht hatte (Tab. E 28).

Tab. E 28: Vergleich der SIR-Verteilung des Gesamtkollektivs in **RPMI-MB** und **RPMI-E** im Mikrodilutionstest (Inkubationszeit: 48 Std.)

Antimykotikum	Nährboden	S	I	R	Total N	S	I	R	Total %
APH	RPMI-E	3	14	41	58	5,2	24,1	70,7	100
	RPMI-MB	1	4	53	58	1,7	6,9	91,4	100
	Differenz	2	10	-12	0	3,5	17,2	-20,7	0
FCA	RPMI-E	39	2	17	58	67,2	3,4	29,3	100
	RPMI-MB	48	5	5	58	82,8	8,6	8,6	100
	Differenz	-9	-3	12	0	-15,6	-5,2	20,7	0

Während gegenüber Amphotericin B 20,7% mehr Isolate des Gesamtkollektivs in RPMI-MB Resistenzen zeigten, waren gegenüber **Fluconazol** in RPMI-E 20,7% mehr Resistenzen zu verzeichnen (Tab. E 28). Obwohl die meisten Isolate (74,1%) des Gesamtkollektivs in beiden Medien gleich gegenüber Fluconazol reagierten, verhielten sich 27,3% der *C. albicans*-Isolate in RPMI-MB (also mit Zugabe von Methyleneblau) sensibler als in RPMI-E (Tab. E 29). Auf der anderen Seite reagierten zwei der zwölf non - *C. albicans* - Isolate in RPMI-E sensibler als in RPMI-MB. Wie sich in Tab. E 30b zeigt, handelt es sich hierbei um die beiden *C. pelliculosa* – Isolate.

Tabelle E 29: Vergleich der Empfindlichkeiten der Hefen gegenüber APH, bzw. FCA im Mikrodilutionstest in **RPMI-E** und **RPMI-MB** basierend auf der SIR-Einteilung (Inkubationszeit: 48 Std.)

Antimykotikum	Gruppe	N	RP-E=RP-MB		RP-E>RP-MB		RP-MB>RP-E	
			n	%	n	%	n	%
APH	Calb	44	33	68,1	11	25	3	6,8
	nCalb	12	9	75	3	25	0	0
	nCan	2	2	100	0	0	0	0
	Total	58	41	70,6	14	24,2	3	5,1
FCA	Calb	44	31	70,5	1	2,3	12	27,3
	nCalb	12	10	83,3	2	16,7	0	0
	nCan	2	2	100	0	0	0	0
	Total	58	43	74,1	3	5,2	12	20,7

RP-E=RP-MB: Ergebnis in beiden Nährmedien gleich (Muster: SS; II; RR)

RP-E>RP-MB: Testergebnis in RP-E sensibler als in RP-MB (Muster: SI; IR; SR)

RP-MB>RP-E: Testergebnis in RP-MB sensibler als in RP-E (Muster: IS; RI; RS)

Wie die Detailanalyse zeigte, ergaben sich gegenüber **Amphotericin B** nur insgesamt drei major-Differenzen (Tab. E 30a). Es handelte sich dabei um zwei *C.albicans*-Isolate und um ein *C. pelliculosa*-Isolat. In allen drei Fällen reagierten die Isolate ohne Zugabe von Methyleneblau (also in RPMI-E) sensibel und mit Zugabe (also in RPMI-MB) resistent. Auffällig war auch die geringe Rate an Differenzen in der non - *C.albicans* - Gruppe.

Gegenüber **Fluconazol** hingegen lagen bei 27,3% aller Isolate major-Differenzen vor. Diese setzten sich ausschließlich aus *C. albicans* – Isolaten zusammen und verhielten sich in RPMI-E (also ohne Methyleneblau) resistent und in RPMI-MB sensibel (Tab. E 30b). Während also rund ein Viertel der untersuchten Hefen gegenüber Amphotericin B ohne Zugabe von Methyleneblau sensibler reagierten, verhielt sich etwa der gleiche Anteil gegenüber FCA mit Zugabe von Methyleneblau zum Medium sensibler.

Tab. E 30: Isolat-bezogene SIR-Empfindlichkeitsmuster-Analyse der Ergebnisse des Mikrodilutionstests im Nährmedium **ohne Methyleneblau** (RPMI-E) und im Nährmedium mit **Methyleneblau** (RPMI-MB) (Inkubationszeit: 48 Stunden)
Empfindlichkeitsmuster: RPMI-E (1. Buchstabe); RPMI-MB (2. Buchstabe)

a) gegenüber Amphotericin B

N-Zahl-Tabelle Genus / Spezies	Empfindlichkeitsmuster (n)						Total-N =100%	Differenzen (n)			Differenzen (%)		
	SR	IS	II	IR	RI	RR		Keine	minor	major	keine	minor	major
<i>C. albicans</i>	2	1	2	9	2	28	44	30	12	2	68,2	27,3	4,5
<i>C. dubliniensis</i>				1		1	2	1	1	0	50	50	0
<i>C. kefyr</i>						1	1	1	0	0	100	0	0
<i>C. krusei</i>						1	1	1	0	0	100	0	0
<i>C. norvegensis</i>						2	2	2	0	0	100	0	0
<i>C. parapsilosis</i>						1	1	1	0	0	100	0	0
<i>C. pelliculosa</i>	1			1			2	0	1	1	0	50	50
<i>C. tropicalis</i>						3	3	3	0	0	100	0	0
nCalb	1			2		9	12	9	2	1	75	16,7	8,3
<i>T. mucooides</i>						2	2	2	0	0	100	0	0
Total	3	1	2	11	2	39	58	41	14	3	70,7	24,1	5,2

b) gegenüber Fluconazol

N-Zahl-Tabelle Genus / Spezies	Empfindlichkeitsmuster (n)					Total-N =100%	Differenzen (n)			Differenzen (%)		
	II	RR	RS	SI	SS		keine	minor	major	keine	minor	major
<i>C. albicans</i>		2	12	1	29	44	31	1	12	70,5	2,3	27,3
<i>C. dubliniensis</i>	1				1	2	2	0	0	100,0	0,0	0,0
<i>C. kefyr</i>					1	1	1	0	0	100,0	0,0	0,0
<i>C. krusei</i>		1				1	1	0	0	100,0	0,0	0,0
<i>C. norvegensis</i>	1	1				2	2	0	0	100,0	0,0	0,0
<i>C. parapsilosis</i>					1	1	1	0	0	100,0	0,0	0,0
<i>C. pelliculosa</i>				2		2	0	2	0	0,0	100,0	0,0
<i>C. tropicalis</i>		1			2	3	3	0	0	100,0	0,0	0,0
nCalb	2	3		2	5	12	10	2	0	83,3	16,7	0,0
<i>T. mucoides</i>					2	2	2	0	0	100,0	0,0	0,0
Total	2	5	12	3	36	58	43	3	12	74,1	5,2	20,7

Differenz: keine: SS; II; RR minor: SI; IS; IR; RI major: SR; RS

Die beiden untersuchten *C. pelliculosa* – Isolate zeigten gegenüber beiden Antimykotika eine höhere Empfindlichkeit ohne die Zugabe von Metylenblau, während die zwei *Trichosporon mucoides* – Isolate in beiden Medien gegenüber Amphotericin B gleichermaßen resistent und gegenüber Fluconazol gleichermaßen sensibel reagierten.

3.2.4 Vergleich der Ergebnisse des Mikrodilutionstests mit denen des E-Testes für die Nährmedien YST und RPMI-E bei Verwendung von Amphotericin B

Es zeigte sich in der Empfindlichkeitsmuster-Analyse, dass in beiden Medien bei rund zwei Dritteln (YST: 70,7%; RPMI-E: 62,1%) aller Isolate eine major-Differenz zwischen den beiden Testmethoden resultierte (Tab. E 31a und b). Dabei reagierten die Hefen in allen Fällen im E-Test sensibel und beim Mikrodilutionstest resistent. Bei beiden Testmethoden identisch verhielten sich hingegen nur drei Isolate in YST, bzw. sechs Isolate in RPMI-E, wobei sich die betreffenden Stämme aus allen drei Subkollektiven zusammensetzten. Die Anzahl an major-Differenzen zwischen den E-Test- und den Mikrodilutionstest-

Ergebnissen unter den *C. albicans*-Isolaten lag mit 81,8% in YST deutlich höher als in RPMI-E (68,2%), während unter den nCalb-Isolaten in RPMI-E häufiger major-Differenzen resultierten als in YST (41,7% vs. 33,3%).

Tab. E 31: Isolat-bezogene SIR-Empfindlichkeitsmuster-Analyse gegenüber Amphotericin B: Ergebnis im MDT (1.Buchstabe) vs. im E-Test (2.Buchstabe) nach 48 Stunden

a) in YST

N-Zahl-Tabelle	Empfindlichkeitsmuster MDT vs. E-Test						Differenz (n)			Differenz (%)		
	IS	RI	RR	RS	SS	Total	keine	minor	major	keine	minor	major
<i>C. albicans</i>	5	2		36	1	44	1	7	36	2,3	15,9	81,8
<i>C. dubliniensis</i>				2		2	0	0	2	0	0	100
<i>C. kefyr</i>				1		1	0	0	1	0	0	100
<i>C. krusei</i>			1			1	1	0	0	100	0	0
<i>C. norvegensis</i>		2				2	0	2	0	0	100	0
<i>C. parapsilosis</i>		1				1	0	1	0	0	100	0
<i>C. pelliculosa</i>	1			1		2	0	1	1	0	50	50
<i>C. tropicalis</i>		3				3	0	3	0	0	100	0
nCalb Ergebnis	1	6	1	4		12	1	7	4	8,3	58,3	33,3
<i>T. mucooides</i>			1	1		2	1	0	1	50	0	50
Total	6	8	2	41	1	58	3	14	41	5,1	24,1	70,7

Differenzen: keine: SS; II; RR minor: SI; IS; IR;RI major: SR; RS

b) in RPMI-E

N-Zahl-Tabelle	Empfindlichkeitsmuster MDT vs. E-Test						Differenz (n)			Differenz (%)		
	IS	RI	RR	RS	SS	Total	keine	minor	major	keine	minor	major
<i>C. albicans</i>	12			30	2	44	2	12	30	4,5	27,3	68,2
<i>C. dubliniensis</i>	1			1		2	0	1	1	0	50	50
<i>C. kefyr</i>				1		1	0	0	1	0	0	100
<i>C. krusei</i>			1			1	1	0	0	100	0	0
<i>C. norvegensis</i>				2		2	0	0	2	0	0	100
<i>C. parapsilosis</i>			1			1	1	0	0	100	0	0
<i>C. pelliculosa</i>	1				1	2	1	1	0	50	50	0
<i>C. tropicalis</i>		2		1		3	0	2	1	0	66,7	33,3
nCalb Ergebnisse	2	2	2	5	1	12	3	4	5	25	33,4	41,7
<i>T. mucooides</i>			1	1		2	1	0	1	50	0	50
Total	14	2	3	36	3	58	6	16	36	10,4	27,5	62,1

Differenzen: keine: SS; II; RR minor: SI; IS; IR;RI major: SR; RS

3.3 Untersuchungen zum Einfluss der Nährmedien an den Kontrollstämmen

Bei der Untersuchung der Kontrollstämmen wurde der Mikrodilutionstest nicht wie bei den Testen der klinischen Isolate nur mit den Antimykotika Amphotericin B und Fluconazol durchgeführt, sondern zusätzlich um die Antimykotika Flucytosin (FCY), Itraconazol (ITR) und Voriconazol (VOR) erweitert. Bei den Untersuchungen wurde deutlich, dass, abhängig vom verwendeten Antimykotikum, unterschiedlich starke Differenzen zwischen den in den verschiedenen Medien erzielten Ergebnissen resultierten (Tabellenanhang: Tab. E 32, E 33).

Tendenziell spiegelten sich die gefundenen Trends an den kumulativen resistenten Anteilen der Kontrollstämmen wider (Tab. E 34).

Tabelle E 34: Anteil der resistenten Isolate gemäß der SIR-Einteilung der Kontrollstämmen gegenüber unterschiedlichen Antimykotika auf verschiedenen Nährmedien nach 48 Std.(Auszug aus Tab. E 33)

Medium		Anteil resistenter Isolate					Total
		APH	FCA	ITR	VOR	FCY	
RPMI-E	n	16	5	11	5	3	16
	%	100	31,3	68,8	31,3	18,8	100
RPMI-S	n	2	2	2	1	4	14
	%	14,3	14,3	14,3	7,1	28,6	100
RPMI-MB	n	15	3	8	3	5	16
	%	93,8	18,8	50,0	18,8	31,3	100
YST	n	16	2	5	0	6	16
	%	100	12,5	31,3	0,0	37,5	100

4. Diskussion

4.1 Art-Verteilung der Hefe-Isolate

Grundlage der Empfindlichkeits-Testungen dieser Arbeit bildeten 145 klinische Hefe-Isolate aus der Routinediagnostik mit einem bewusst gewählten Schwerpunkt (84,1%, n=122) von Isolaten aus dem Mund- und Rachen-Bereich. Die Art-Verteilung dieses Kollektives, mit 89 (73%) *C. albicans*-, 31 (25,4%) non-*C. albicans*- und zwei (1,6%) non-*Candida*-Isolaten (Tab. M 02, MR-Bereich) entsprach mit einer gewissen Schwankungsbreite der in der Literatur zu erwartenden Verteilungen (Tab. D 01).

So zeigte sich z.B. in einer Studie mit 136 älteren Versuchspersonen (Alter: > 60 Jahre) aus Minas Gerais/Brasilien eine orale Hefe-Verteilung von 62,7% *C. albicans*- und 37,3% non-*C. albicans*-Isolaten (20% *C. tropicalis*, 9,3% *C. glabrata*, 5,3% *C. parapsilosis* und 2,7% *C. guilliermondii*) (RESENDE DE et al. 2006). *C. albicans* machte damit, wie auch in der vorliegenden Arbeit und in

Tab. D 01 : Art-Verteilung der Hefen im Mundraum in verschiedenen Studien

Autor(en)	Darwazeh et al		Cartledge et al.		Hamza et al.		Badiee et al.		Mane et al.		Eigene Ergebnisse	
Herkunft der Patienten	Jordanien		England		Tanzania		Iran		Indien		Deutschland	
Spezies	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
<i>C. albicans</i>	84,5	78	89,7	826	84,5	250	49,2	96	80,9	76	73	80
<i>C. glabrata</i>	2,9	3	5,9	54	6,8	20	23,1	45	4,3	4	7,4	9
<i>C. tropicalis</i>			0,7	6	2,7	8	1	2	5,3	5	3,3	4
<i>C. parapsilosis</i>							1,5	3	5,3	5	4,1	5
<i>C. krusei</i>			2,2	20	3,4	10	11,8	23	3,2	3	2,5	3
<i>C. kefyr</i>	8,7	9	0,2	2	1	3	2,6	5			1,6	2
<i>C. dubliniensis</i>					0,3	1	9,7	19			2,5	3
andere <i>Candida</i> -	1	1	0,3	3	0,3	1			1,1	1	4	5
<i>Saccharomyces spp.</i>	8,7	9	1,1	10	1	3						
andere Hefe-Spezies	3	3 ^a									1,6	2 ^b
Total (n = 100%)		103		921		296		195		94		122

^a *Aspergillus niger* (n=1), *Yarrowia lipolytica* (n=1), *Cryptococcus laurionitii* (n=1)

^b *Geotrichum (G.) capitatum* (n=1); *Rhodotorula (R.) mucillaginosa* (n=1)

anderen Arbeiten (Tab. D 01), den größten Anteil der im Mund-/Rachen-Bereich vorkommenden Hefearten aus.

Jedoch scheint *C. albicans* nicht universell in der Mundhöhle die vorherrschende Hefeart zu sein, wie eine Untersuchung der geografischen Unterschiede in der oralen Hefeflora des Menschen am Beispiel Zentral-Chinas (239 Personen) und der Ostküste Nordamerikas (483 Personen) zeigte (XU et al. 2003): Bei dem Kollektiv aus Nordamerika waren 90,6% der isolierten Hefen *Candida albicans*, während dieser Anteil bei den Isolaten aus China nur 9,4% ausmachte. *C. parapsilosis* (39,4%) und *C. guilliermondii* (21,3%) wurden als überwiegende Hefespezies bei dem Untersuchungskollektiv aus China nachgewiesen, während bei den untersuchten Personen aus Nordamerika *C. guilliermondii* 0% bzw. *C. parapsilosis* nur 3,1% des Gesamtkollektivs ausmachten.

Auch andere Autoren stellten regionale Unterschiede in den Hefeverteilungen fest: In einer Studie mit 256.882 Hefe-Isolaten aus 41 verschiedenen Ländern wurde im Zeitraum zwischen 1997 und 2007 die Hefeverteilung in fünf Regionen der Welt verglichen (PFALLER et al. 2010). Die Isolate stammten dabei jedoch von verschiedenen Körperregionen. Der Anteil an *C. albicans* machte in jener Studie zwischen 64% und 67% der Isolate aus den Räumen Asien/Pazifik, Europa und Nahost/Afrika aus, aber nur 51,8% der Isolate aus Lateinamerika und 48,9% der Isolate aus Nordamerika. Die zweithäufigste Hefe in Nordamerika war mit 21,1% *C. glabrata*, während diese Spezies in Europa einen Anteil von 11,3%, in Lateinamerika sogar nur von 7,4% ausmachte. In Lateinamerika war *C. tropicalis* mit 13,2% relativ verbreitet, wohingegen diese Spezies in Europa mit 4,9% des Gesamtkollektivs deutlich seltener vorkam. Bei einigen Spezies veränderte sich jedoch über den Zeitraum der Studie die Prävalenz: So verringerte sich der Anteil von *C. albicans* am Gesamtkollektiv in den ersten sieben Jahren um 8%, *C. glabrata*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* gewannen hingegen an Bedeutung mit einer Zunahme zwischen 1,5 und 2,6%.

Im europäischen Raum ist bei Trägern von acrylathaltigen Totalprothesen *C. albicans* die Spezies, die am häufigsten in der Mundhöhle nachgewiesen werden kann: In einer Untersuchung von 128 Prothesenträgern wurden bei 27,7% derer ohne orale Stomatitis und 81,5% derer mit oraler Stomatitis *C. albicans* nachgewiesen (FIGUEIRAL et al.2007). Dabei lag der Wert höher als in einer Studie aus 2003, in der gezeigt werden konnte, dass in 72% der Fälle *C. albicans* an der Entstehung einer durch Totalprothesen bedingten Stomatitis beteiligt war. Mit jeweils 8,5% waren *C. krusei* und *C. tropicalis*, gefolgt von *C. glabrata* (6,3%) die nächst häufigsten *Candida*-Arten (DAR-ODEH et al. 2003).

4.2 Empfindlichkeitsverteilung gegenüber Amphotericin B und Fluconazol

Die in vitro - Empfindlichkeitstestung in der oben erwähnten Studie von DAR-ODEH et al. (2003) erfolgte mittels E-Test. Alle isolierten *C. albicans*-Isolate erwiesen sich gegenüber Amphotericin B (MHK₉₀= 0,75mg/l) als sensibel. Gegenüber Fluconazol (MHK₉₀=6mg/l) waren 92% der *C. albicans*-Isolate sensibel.

In der vorliegenden Arbeit verhielten sich 96% der *C. albicans*-Isolate sensibel gegenüber Amphotericin B (MHK₉₀=0,25mg/l, MHK₅₀=0,25mg/l). Jedoch lag die Amphotericin B-Konzentration bis zu der ein Isolat als sensibel bezeichnet wurde in der Studie von DAR-ODEH et al. (2003) bei 1mg/l, wohingegen in dieser Arbeit ein Breakpoint von 0,25mg/l zugrunde gelegt wurde. Beim Vergleich der MHK₉₀-Werte gegenüber Amphotericin B wurde deutlich, dass die aus dem Mund- und Rachenraum isolierten *C. albicans*-Isolate in der vorliegenden Arbeit empfindlicher gegenüber Amphotericin B waren als die in den Untersuchungen von DAR-ODEH et al. (2003): Es lag eine Differenz der MHK₉₀-Werte von drei E-Test-, bzw. zwei geometrischen Konzentrationsstufen vor.

Bei einer Untersuchung der Empfindlichkeiten von 56 *Candida albicans*-Isolaten von HIV-Patienten mit oropharyngealer Candidiasis resultierten im E-Test gegenüber Amphotericin B ein MHK₉₀-Wert von 0,78mg/l und ein MHK₅₀-Wert von 0,39mg/l (RUHNKE et al.1996). Beide Referenzwerte lagen also, bei Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegten Breakpoints, im intermediär-sensiblen Bereich. Gegenüber Fluconazol erwies sich der MHK₅₀-Wert mit 25mg/l ebenfalls als intermediär-sensibel, wohingegen MHK₉₀ (≥ 265 mg/l) im resistenten Bereich lag. Eine Übereinstimmung der E-Test-Ergebnisse mit der parallel getesteten Mikrodilution lag bei Amphotericin B in 78%, bei Fluconazol in 67% der Fälle vor.

4.3 Einflussnahme der Testmethode

Die in vitro - Empfindlichkeiten von Hefe-Isolaten werden in unterschiedlichem Maße von der angewandten Testmethode beeinflusst, wie dies auch die folgende Untersuchung an 30 Patienten mit Zahnprothesen assoziierter Candidiasis (KOGA-ITO et al. 2008) zeigte. Während im E-Test MHK₅₀ und MHK₉₀ gegenüber Amphotericin B mit 0,5mg/l im intermediär-sensiblen Bereich lagen, war der MHK₉₀-Wert im Mikrodilutionstest (nach CLSI M-27 A2-Protokoll) mit 8mg/l im resistenten Bereich zu finden. Der MHK₅₀-Wert war 1mg/l.

Gegenüber Fluconazol war die Differenz zwischen den Ergebnissen der beiden Testmethoden noch deutlicher: Im E-Test lagen beide Referenzwerte mit 0,25mg/l (MHK₅₀) und 0,75mg/l (MHK₉₀) im sensiblen Empfindlichkeitsbereich. Im Mikrodilutionstest befand sich der MHK₅₀ Wert mit 8mg/l zwar noch im sensiblen Bereich, aber dennoch bei einer signifikant höheren Konzentration (Differenz von fünf geometrischen Stufen). Der MHK₉₀-Wert war mit einer Konzentration von 64mg/l hingegen als resistent zu bewerten. Mit einer Differenz von sieben geometrischen Stufen gegenüber dem MHK₉₀-Wert des E-Tests war auch dieser Wert als signifikant höher einzustufen. Die

Übereinstimmung der Ergebnisse von E-Test und Mikrodilutionstest lag bei Amphotericin B bei 66,7%, bei Fluconazol bei 53,3%.

In den eigenen Untersuchungen ergaben sich ähnlich hohe Werte bei der Untersuchung von Amphotericin B: 66,7% der Isolate zeigten eine Übereinstimmung (Differenz ≤ 2 Verdünnungsstufen) in den Ergebnissen von E-Test und Mikrodilution. Bei 32,6% des Gesamtkollektivs waren die MHK-Werte des E-Tests signifikant niedriger als die des Mikrodilutionstests (Differenz > 2 Verdünnungsstufen). Bei der Testung mit Fluconazol lag die Übereinstimmung mit 88,2% hingegen deutlich höher als in der Studie von Koga-Ito mit 53,3%.

In einer Untersuchung an 121 klinischen *Candida*-Isolaten, deren Empfindlichkeits-Verteilung gegenüber Amphotericin B sowohl im E-Test als auch im Mikrodilutionstest untersucht worden war, zeigten 15,7% des Gesamtkollektivs im E-Test einen um mindestens zwei Verdünnungsstufen geringeren MHK-Wert als im Mikrodilutionstest (ARENDRUP et al. 2001). Bei den übrigen 84,3% der Isolate lag eine Übereinstimmung (Differenz von ≤ 2 Konzentrationsstufen) zwischen den Ergebnissen der beiden Testmethoden vor. Gegenüber Fluconazol stimmten die Ergebnisse von 76 % der Isolate in beiden Testverfahren überein (Differenz von ≤ 2 Verdünnungsstufen). 4% aller Isolate reagierten im E-Test jedoch sensibler als im Mikrodilutionstest (Differenz von > 2 Konzentrationsstufen). Die übrigen 20% (24 *C. albicans*-Isolate und ein *C. tropicalis*-Isolat) konnten wegen des Auftretens eines Trailing-Phänomens nicht ausgewertet werden.

Noch höhere Kongruenzen zwischen E-Test und Mikrodilution zeigten sich in einer Studie des Mikrobiologischen Instituts der Universität Heidelberg an 512 *Candida*-Spezies: 88,7% der gegenüber Amphotericin B getesteten Isolate wiesen übereinstimmende Ergebnisse in den beiden Testverfahren (Differenz von ≤ 2 Verdünnungsstufen) auf, bei Fluconazol waren es sogar 97,5% (FLECK et al. 2007)

Bei den anderen von FLECK et al. untersuchten Antimykotika - Flucytosin, Voriconazol und Caspofungin - traten ebenfalls kaum nennenswerte Unterschiede auf (Übereinstimmung von > 96%). Dennoch werden Differenzen zwischen den Test-Ergebnissen mit Blick auf das Resistenzverhalten der Hefen deutlich: 5,6% der *C. glabrata*-Isolate waren im Mikrodilutionstest (MDT) resistent gegenüber Amphotericin B, während im E-Test keine resistenten Isolate dieser Spezies vorkamen. Gegenüber Fluconazol erwiesen sich im MDT 5%, im E-Test 8,1% der *C. glabrata*-Isolate als resistent. Bei *C. krusei* zeigten sich gegenüber Fluconazol im E-Test deutlich mehr Isolate resistent (94,7%) als im MDT (15,8%). Gegenüber Amphotericin B waren im E-Test 21,1%, im MDT hingegen 52,8% der *C. krusei*-Isolate resistent. In dieser Studie fanden sich also gegenüber Amphotericin B mehr resistente Isolate im MDT, gegenüber Fluconazol hingegen im E-Test. Auch gegenüber den hier nicht näher erwähnten Antimykotika Flucytosin und Voriconazol kamen im E-Test zumeist mehr Resistenzen vor als im MDT.

Die eigenen Untersuchungen zeigten ein ähnliches Bild: Im Mikrodilutionstest erwiesen sich 87,5% des Gesamtkollektivs als resistent gegenüber Amphotericin B, im E-Test lediglich 7,6%. Annähernd gleich viele Resistenzen kamen hingegen bei beiden Testverfahren gegenüber Fluconazol vor (E-Test: 6,2%, MDT: 8,3%).

Es zeigte sich also, dass die Unterschiede in der Empfindlichkeitsverteilung in den zwei Testverfahren bei verschiedenen Antimykotika nicht einheitlich waren sondern teilweise sogar konträr.

Für Posaconazol fanden sich in einer Testung von 124 *C. albicans*-Isolaten im E-Test tendenziell höhere MHK-Werte als im Mikrodilutionstest (SIMS et al. 2006): Der MHK₉₀-Wert lag mit 8mg/l im E-Test zwei Verdünnungsstufen über dem entsprechenden Wert des Mikrodilutionstestes (2mg/l). Im E-Test erwiesen sich 13,9% der Isolate, im MDT 15% als resistent. Die Übereinstimmung der

beiden Testmethoden innerhalb einer Differenz von ± 2 Verdünnungsstufen betrug 82%.

In der eigenen Arbeit zeigte sich bei der Untersuchung der Kontrollstämme ebenfalls, dass der Einfluss der Testmethode auf die Hefe-Empfindlichkeiten in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Antimykotikum variiert (Kapitel 3.1.2): Der MHK₉₀-Wert lag in der Untersuchung mit Itraconazol im E-Test bei $> 4\text{mg/l}$ und damit mehr als zwei Verdünnungsstufen höher als im Mikrodilutionstest (MHK₉₀=1mg/l). Gegenüber Amphotericin B erwies sich dasselbe Hefe-Kollektiv jedoch im E-Test als empfindlicher.

Auch in anderen Studien wurden die unterschiedlichen Reaktionen auf die beiden Testverfahren bei Verwendung verschiedener Antimykotika thematisiert: OZCAN et al. (2010) beschrieb in seiner Untersuchung an 46 *Candida*-Isolaten größere Übereinstimmungen zwischen den in den beiden Testmethoden (E-Test und Mikrodilutionstest) ermittelten Empfindlichkeiten gegenüber Voriconazol (95,6%), als gegenüber Amphotericin B (84,7%) und Fluconazol (80,4%).

Die Relation der Ergebnisse von E-Test und Mikrodilution zueinander scheint außerdem bei verschiedenen *Candida*-Spezies unterschiedlich zu sein:

So lag die Übereinstimmung zwischen den beiden Testverfahren bei *C. dubliniensis*, *C. krusei* und *C. lusitaniae* in der bereits zitierten Studie von SIMS et al. (2006) bei je 100%, bei *C. glabrata* hingegen nach 48 Stunden nur bei 77,8%. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erwiesen sich sogar nur 25% der Ergebnisse von Mikrodilutions- und E-Test als identisch. Vermutlich hängt diese Diskrepanz mit den Wachstumseigenschaften von *C. glabrata* zusammen (OZCAN et al., 2010).

In einer Studie an 238 *Candida*-Isolaten unterschiedlicher Spezies wurde die Empfindlichkeitsverteilung gegenüber Fluconazol in verschiedenen Testverfahren untersucht. *C. albicans* reagierte im Mikrodilutionstest deutlich

empfindlicher als im E-Test, *C. tropicalis* und *C. glabrata* hingegen verhielten sich im E-Test sensibler und *C. parapsilosis* erwies sich als unabhängig von der Testmethode (Tab. D 02, D.L. SEWELL et al. 1994).

Tab. D 02: Vergleich der MHK50- und MHK90-Werte verschiedener *Candida*-Spezies in Abhängigkeit von der Methode der Empfindlichkeitsbestimmung (SEWELL et al (1994), Auszug aus Tabelle 1)

Spezies (n)	Testmethode	MHK50 (mg/l)	MHK90 (mg/l)
<i>C. albicans</i> (122)	E-Test	1	>256
	Mikrodilution	0,5	1
<i>C. parapsilosis</i> (23)	E-Test	1	4
	Mikrodilution	1	4
<i>C. tropicalis</i> (45)	E-Test	0,25	0,5
	Mikrodilution	1	>512
<i>C. glabrata</i> (41)	E-Test	1	4
	Mikrodilution	8	32

In der bereits zitierten Studie von FLECK et al. (2007) ließen sich derartige Unterschiede zwischen den *Candida*-Spezies nicht bestätigen: Hier lagen die MHK90-Werte von *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* im Diffusionstest gleichermaßen eine Verdünnungsstufe niedriger als im Mikrodilutionstest. Für *C. krusei* resultierten in beiden Testverfahren MHK90-Werte von 2mg/l, womit sich lediglich eine geringfügige Differenz gegenüber dem Verhalten der anderen *Candida*-Spezies abzeichnete.

Die Ursache für die von manchen Autoren beschriebenen unterschiedlichen Verhaltensreaktionen verschiedener Hefen in E-Test und Mikrodilution gegenüber demselben Antimykotika ist bis dato unklar.

Ein Grund dafür mag jedoch in der Verwendung von unterschiedlichen Nährmedien bei den unterschiedlichen Formen der Empfindlichkeitstestung liegen.

So gibt das CLSI M27-A3 Protokoll für die Mikrodilutionstestung von Antimykotika RPMI1640 als Medium vor, für Disc-Diffusionstests in dem Protokoll

M44-A2 Müller-Hinton Agar mit 0,5mg/l Methylenblau. Der E-Test ist von seinem Grundcharakter zu den Diffusionstesten zu rechnen. Eine normgerechte Empfindlichkeitstestung verlangt dann die Verwendung unterschiedlicher Nährmedien, wie es in der bereits zitierten Studie von SIMS et al. (2006) konsequenterweise erfolgte.

Im Folgenden wird daher der Frage nach der Einflussnahme der Nährmedien auf das Ergebnis der Empfindlichkeitsbestimmung von Hefen der Gattung *Candida* nachgegangen.

4.4 Einflussnahme des Nährmediums

In der Literatur stand bereits mehrfach der Einfluss des Nährmediums auf die minimalen Hemmkonzentrationen in der Empfindlichkeits-Testung von Pilzen zur Diskussion: In einer Studie an 4936 *Candida*-Isolaten wurde im E-Test gegenüber Amphotericin B untersucht, inwieweit die Nährmedien Müller-Hinton-Agar (MH-Agar) (mit 0,5mg/l Methylenblau) und RPMI1640 Einfluss auf die MHK-Werte der Hefen hatten (PFALLER et al. 2004). Die auf MH-Agar ermittelten MHK-Werte erwiesen sich dabei als geringfügig niedriger (Differenz < 2 geometrische Stufen) als die auf RPMI1640. Eine Übereinstimmung auf beiden Nährmedien lag je nach untersuchter Spezies zwischen 86,4% (*C. tropicalis*) und 98,1% (*C. albicans*).

Zu einem ähnlichen Ergebnis war PFALLER et al. schon 2003 bei der Untersuchung von 236 *C. glabrata*-Isolaten im E-Test gekommen: Auf RPMI1640 traten bei 14% der Isolate Resistenzen gegenüber Fluconazol auf, auf Müller-Hinton-Agar (mit 0,5mg/l Methylenblau) hingegen nur bei 12%. Die Reproduzierbarkeit der E-Test-Ergebnisse von drei Testansätzen erwies sich in einer Studie an 50 *Candida*-Isolaten gegenüber Fluconazol bei beiden Medien als annähernd gleich: Die direkte Übereinstimmung der MHK-Werte (Differenz von ± 0 Verdünnungsstufen) lag mit 63,1% auf Müller-Hinton-Agar (mit 0,5mg/l Methylenblau) geringfügig höher (60,7% auf RPMI₁₆₄₀), während die

Reproduzierbarkeit mit einer Schwankungsbreite von ± 1 Verdünnungsstufe mit 94% der Isolate auf RPMI1640 höher war als auf MH-Agar (90,2%) (BARRY et al. 2002).

Die Ursache für das zum Teil unterschiedliche Verhalten der Hefen in den beiden Nährmedien ist möglicherweise in deren Zusammensetzung zu finden. Die Medien unterschieden sich im Wesentlichen in drei Bestandteilen, nämlich im Basismedium (RPMI vs. Müller-Hinton-Agar), im Puffersystem (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) nur in RPMI1640) und im Zusatz von Methylblau (nur im MH-Agar).

Der Einfluss dieser Komponenten (Basismedium, Puffer, Methylblau-Zusatz) wurde in der vorliegenden Arbeit am Empfindlichkeitsverhalten von 59 *Candida*-Isolaten, die in den Voruntersuchungen ein verlässliches Wachstum gezeigt hatten, modellhaft untersucht. Hierfür erfolgte die Empfindlichkeitbestimmung aus demselben Inokulum gleichzeitig in Yeast-Susceptibility-Testmedium (YST + Phosphatpuffer + 0,5mg/l Methylblau) und drei RPMI-Derivaten mit unterschiedlichen Zusammensetzungen (*RPMI-E*: RPMI + MOPS; *RPMI-MB*: RPMI + MOPS + 0,5mg/l Methylblau; *RPMI-S*: RPMI + Phosphatpuffer + 0,5mg/l Methylblau) im Mikrodilutionstest.

4.4.1 Einfluss des Basismediums

29,3% der Isolate zeigten bei der Untersuchung der Basismedien YST und RPMI-S (beide Medien mit Phosphatpuffer und 0,5mg/l Methylblau) im Test gegenüber Amphotericin B eine major-Differenz (Differenz von zwei SIR-Empfindlichkeitsklassen: sensibel-resistent, bzw. resistent-sensibel). 16 dieser 17 *Candida*-Isolate (11 *C. albicans* und verschiedene andere *Candida*-Hefen) reagierten in RPMI-S sensibel und in YST resistent. Gegenüber Fluconazol zeigten sich bei 36,8% major-Differenzen, wobei alle besagten 21 *Candida*-Isolate (20 *C. albicans* und ein *C. dubliniensis*) in RPMI resistent waren, in YST hingegen sensibel. In den eigenen Untersuchungen wurde also ein

Antimykotika spezifischer Einfluss des Basismediums auf die Hefe-Empfindlichkeit deutlich.

In einer Studie an acht *Candida*-Kontroll-Stämmen wurden deren Empfindlichkeiten gegenüber Caspofungin im Mikrodilutionstest untersucht. Dabei fand die Testung parallel in den Nährmedien AM3, RPMI1640 und anderen statt (BARTIZAL et al. 2003). Beide Nährmedien wurden mittels eines 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure-Puffers (MOPS) auf pH7 eingestellt und beinhalten kein Methylenblau, sodass die Basismedien direkt verglichen werden konnten. Bei einer Verdünnung von 2×10^3 Kolonien/ml lag der MHK₅₀-Wert in AM3 bei 0,28mg/l, in RPMI1640 bei 1,2mg/l, und auch der MHK₉₀-Wert war in AM3 (0,41mg/l) deutlich niedriger angesiedelt als in RPMI1640 (1,54mg/l). Damit zeigte sich auch für Caspofungin ein Einfluss der Basismedien auf die Empfindlichkeitsergebnisse in der Testung von Hefen, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit für Amphotericin B und Fluconazol.

An 312 *Candida*-Isolaten verschiedener Spezies wurde in einer Studie der Einfluss verschiedener Medien und Testverfahren auf die MHK-Werte gegenüber Voriconazol untersucht (PFALLER et al. 2000). Eine Übereinstimmung (Differenz ≤ 2 Verdünnungsstufen) von 98% aller Isolate lag beim Vergleich von E-Test und Mikrodilution (MDT) jeweils auf/in RPMI1640 vor. Die Ergebnisse vom MDT (in RPMI1640) und E-Test in/auf AM3 stimmten hingegen nur in 89% überein. Auch hier war das Basismedium die einzige Variable, die zu der geringeren Übereinstimmung der Ergebnisse führen konnte.

Der Einfluss des Nährmediums auf die MHK-Werte von *Candida*-Isolaten scheint darüber hinaus Art-spezifisch zu variieren. So gab es bei *C. guilliermondii* und *C. lusitaniae* unabhängig vom im E-Test verwendeten Medium eine Übereinstimmung mit der Mikrodilution von 100%, während bei *C. glabrata* zwischen E-Test und MDT im gleichen Medium (RPMI1640) eine 91%ige, zwischen E-Test auf AM3 und MDT in RPMI1640 aber nur eine 58%ige Konkordanz der Ergebnisse vorlag (Tab. D 03).

Tab. D 03: Übereinstimmung (Differenz \leq 2 Verdünnungsstufen) zwischen E-Test auf RPMI1640 bzw. AM3 und der Mikrodilution in RPMI1640 im Test von 312 *Candida*-Spezies gegenüber Voriconazol (PFALLER et al. 2000; Tabelle 2 - Auszug)

Spezies	n	Übereinstimmung (%) MDT (RPMI1640) mit E-Test	
		RPMI1640	AM3
<i>C. albicans</i>	174	99	97
<i>C. glabrata</i>	55	91	58
<i>C. tropicalis</i>	31	100	90
<i>C. parapsilosis</i>	39	100	92
<i>C. krusei</i>	5	100	80
<i>C. lusitaniae</i>	2	100	100
<i>C. guilliermondii</i>	6	100	100
Total	312	98	89

Auch in den eigenen Untersuchungen zeigte sich eine Art-Spezifität hinsichtlich des Einflusses des Nährmediums auf die Hefeempfindlichkeiten: Gegenüber Fluconazol waren 46,5% der *C. albicans*- und 50% der *C. dubliniensis*-Isolate in RPMI-S resistent, jedoch in YST sensibel. Bei den übrigen *Candida*-Spezies lagen dagegen keinerlei major-Differenzen vor.

Im Test gegenüber Amphotericin B waren die Diskrepanzen zwischen den verschiedenen Spezies weniger deutlich ausgeprägt.

4.4.2 Einflussnahme durch das Puffersystem

Zur Untersuchung der Einflussnahme des Puffersystems auf die Hefe-Empfindlichkeiten wurden in den eigenen Untersuchungen die Mikrodilutionsergebnisse bei Verwendung zweier verschiedener RPMI-Derivate verglichen: RPMI-S enthielt einen Phosphatpuffer nach Sørensen, RPMI-MB hingegen 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) als Puffer. Beide Medien waren mit Metylenblau angereichert, wodurch als einziger Unterschied das Puffersystem blieb.

Gegenüber Amphotericin B zeigten 25,9% des Gesamtkollektivs major-Differenzen, von denen sich alle 15 betreffenden Isolate in RPMI-MB als resistent und in RPMI-S als sensibel erwiesen.

Gegenüber Fluconazol fand sich ein dazu genau konträres Verhalten: In 35,1% des Gesamtkollektivs lagen major-Differenzen vor. Darunter erwiesen sich 19 Isolate als sensibel in RPMI-MB und resistent in RPMI-S und nur ein einzelner *C. albicans*-Stamm reagierte in RPMI-S sensibel und dafür in RPMI-MB resistent.

In dieser Untersuchung führte also die Verwendung von Phosphatpuffer in der Testung gegenüber Amphotericin B zu niedrigeren minimalen Hemmkonzentrationen, gegenüber Fluconazol zu höheren als in MOPS-Puffer. Der Einfluss des Puffersystems auf die Hefeempfindlichkeiten zeigte also deutliche Antimykotika-spezifische Unterschiede. Wie schon bei der Untersuchung der Basismedien zeigten in der Testung gegenüber Fluconazol wiederum ausschließlich Isolate der Spezies *C. albicans* (44,2%) und *C. dubliniensis* (50%) „major-Differenzen“ zwischen den mit MOPS- und Phosphatpuffer ermittelten Werten.

Gegenüber Amphotericin B verhielten sich 18,2% der *C. albicans*- und 100% einiger nicht-*C. albicans*-Spezies (*C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. norvegensis* und *C. pelliculosa*) bei Verwendung von MOPS-Puffers resistent, von Phosphatpuffer hingegen sensibel. Auch der Einfluss des Puffersystems ist also ein Art-spezifisches Phänomen.

Mittels Agardilutionstest wurde in einer Untersuchung der Einfluss unterschiedlicher Puffersysteme (Endomethylen-tetrahydrophthalsäure (EMTA), Phosphat, MOPS und ohne Puffer) auf die Empfindlichkeit verschiedener *Candida*-Spezies gegenüber Fluconazol untersucht (WERNER et al. 1993). Als Basismedium diente dabei jeweils Casitone-Agar. Bei Pufferung mit EMTA oder Phosphat wurden etwa gleich hohe MHK-Werte erzielt, wobei alle Hefen auf phosphatgepuffertem Casitone-Agar deutlich langsamer wuchsen. Bei beiden

Puffern lagen die Werte jedoch bis zu sechs Titerstufen (meist Differenzen von ≥ 25 mg/l) unter denen, die bei Zugabe von MOPS- oder ohne Puffer erreicht wurden.

Anders als in den eigenen Untersuchungen reagierten die *Candida*-Stämme in dieser Studie also gegenüber Fluconazol bei Zugabe von MOPS-Puffer weniger empfindlich als mit Phosphatpuffer. Inwieweit das Basismedium Casitone-Agar anstatt RPMI1640 oder YST dabei eine Rolle spielt, bedarf noch einer wissenschaftlichen Abklärung.

In einer anderen Studie wurden modellhaft vier *C. parapsilosis* – Isolate nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Plättchentest parallel auf vier unterschiedlichen RPMI-Derivaten gegenüber Anidulafungin getestet (ODABASI et al. 2003). Eines der vier Isolate reagierte unter Zugabe von Phosphatpuffer zum Basismedium (eingestellt auf pH7) resistent (kein Hemmhof erkennbar), während es bei Verwendung von MOPS-Puffer einen 7mm breiten Hemmhof ausbildete. Die anderen drei Isolate verhielten sich unabhängig vom Puffersystem. Die Senkung des pH-Wertes im Phosphatgepufferten Medium von pH7 auf pH4 führte bei drei der vier Stämme zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Anidulafungin, sodass diese Isolate folglich einen größeren Hemmhof und damit eine höhere Empfindlichkeit aufwiesen als unter MOPS-Pufferung. Die Erhöhung der Konzentration des MOPS-Puffers um das zehnfache hatte hingegen keinen Einfluss auf die Hefe-Empfindlichkeiten.

Der Einfluss des Puffersystems auf die Hefeempfindlichkeiten wurde in der Literatur bislang wenig diskutiert. Zur Verifizierung der in den eigenen Untersuchungen erkennbaren Antimykotika- und Art-Spezifität des Einflusses durch das verwendete Puffersystem bedarf es weiterer wissenschaftlicher Abklärung.

4.4.3 Einflussnahme durch Methylenblau

Der Zusatz von Methylenblau (0,5mg/l) zum Basismedium erfolgt mit der Zielsetzung einer verbesserten Endpunktbestimmung des Wachstums für die Festsetzung der MHK (DIN 58940-81) bzw. der Hemmhofzone (CLSI-Protokoll M44-A2).

Zur Untersuchung des Einflusses von Methylenblau auf die Empfindlichkeiten von *Candida*-Hefen wurden in dieser Arbeit die Nährmedien RPMI-E (ohne Methylenblau) und RPMI-MB (mit 0,5mg/l Methylenblau) verglichen. Beide RPMI-Derivate enthielten MOPS als Puffersystem, sodass die einzige Variable in der Zugabe des Methylenblau-Zusatzes bestand.

Lediglich 5,2% aller Isolate (zwei *C. albicans*- und ein *C. pelliculosa*-Stamm) zeigten gegenüber Amphotericin B deutliche Methylenblau-abhängige Differenzen in ihrer Empfindlichkeit (major-Differenzen), wobei die drei betreffenden Isolate ohne den Zusatz sensibel, mit dem Zusatz jedoch resistent waren.

Gegenüber Fluconazol erwiesen sich 20,7% aller Isolate als Methylenblau-abhängig. Bei allen zwölf betroffenen Isolaten handelte es sich um *C. albicans*-Stämme, was gut ein Viertel dieses Subkollektivs ausmachte. Sie verhielten sich ausnahmslos im Nährmedium mit Methylenblau sensibel und ohne resistent.

Der Einfluss des Methylenblau-Zusatzes auf die minimale Hemmkonzentration der Hefen erwies sich als Antimykotika-abhängig. Dabei war das Ausmaß in der Testung gegenüber Fluconazol ausgeprägter als gegenüber Amphotericin B und in seiner Wirkung konträr zu der gegenüber Amphotericin B.

In einer Studie an 420 *Candida*-Isolaten wurden deren Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Antimykotika im Mikrodilutionstest bei Verwendung unterschiedlicher Nährmedien untersucht (FEGELER et al. 2003). Es zeigte sich auf der Basis der MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte, dass sich unter Zugabe von 0,25mg/l Methylenblau zum High-Resolution-Medium die MHK-Werte in

Abhängigkeit vom Antimykotikum unterschiedlich verhielten: Die MHK₅₀-Werte variierten in beiden Medien maximal um eine Verdünnungsstufe. Sie waren somit als „gleich“ zu betrachten, da die Variationen im Bereich der Schwankungsbreite der Methode lagen. Anders hingegen war das Verhalten der MHK₉₀-Werte. Während die Werte in beiden Medien für Flucytosin und Amphotericin B identisch waren und damit der Methylenblau-Zusatz keinen Einfluss auf die Hefe-Empfindlichkeiten hatte, lagen die MHK₉₀-Werte für die Azolantimykotika mit dem Zusatz niedriger.

Tab. D 04: Einfluss des Methylenblau-Zusatzes auf die minimale Hemmkonzentration von *Candida*-Isolaten gegenüber verschiedenen Antimykotika (FEGELER et al. 2003)

Antimykotika	MHK ₅₀ (mg/l)		MHK ₉₀ (mg/l)	
	HR-Medium	HRM-Medium	HR-Medium	HRM-Medium
Flucytosin	0,125	0,25	32	32
Amphotericin B	2	2	8	8
Fluconazol	4	2	≥ 128	64
Voriconazol	0,125	0,125	≥ 16	1
Itraconazol	0,06	0,125	≥ 8	4

Für Voriconazol erwies sich die Verminderung um mindestens vier Verdünnungsstufen, von ≥ 16mg/l (HR) auf 1 mg/l (HRM), als signifikant. Da die MHK₉₀-Werte für Fluconazol und Itraconazol außerhalb der getesteten Konzentrationen lagen, war für diese beiden Antimykotika nur ein Trend zur Verminderung aufzuzeigen (Tab. D 04).

Auch in dieser Untersuchung wurde also der Antimykotika-spezifische Einfluss des Methylenblau-Zusatzes auf die Hefe-Empfindlichkeiten deutlich.

Entsprechend der eigenen Ergebnisse führte der Zusatz von Methylenblau bei der Testung von Azolantimykotika gleichfalls zu einer Senkung der minimalen Hemmkonzentrationen.

5. Zusammenfassung

Amphotericin B (APH) wird in der oral topischen Form als Suspension oder Lutschtablette am häufigsten als Antimykotikum bei oralen Mykosen eingesetzt. Das Azolantimykotikum Fluconazol (FCA) stellt insbesondere als Suspension oder Trockensaft eine Alternative dar. Zur Empfindlichkeitsbestimmung der Hefen werden unterschiedliche Testverfahren eingesetzt, wobei die Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) mittels E-Test oder Mikrodilutionstest (MDT) nach DIN 58901-84 als häufigste angewandte Verfahren teils unterschiedliche Ergebnisse aufweisen.

An 144 klinischen Hefe-Isolaten wurde daher die Einflussnahme des Testverfahrens (E-Test und Mikrodilutionstest nach DIN 58901-84) untersucht. Als Medium wurde für beide Testverfahren das nach DIN vorgesehene Medium Yeast Susceptibility Testmedium (YST) verwendet. Die Auswertung erfolgte nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation bei 37°C visu ell. Die hier aufgeführten Ergebnisse entstammen der Analyse der MHK-Werte nach 48 Stunden.

Während in 32,6% (n=47) der 144 Hefe-Isolate die MHK-Ergebnisse im E-Test gegenüber APH signifikant niedriger als im Mikrodilutionstest waren, lag ein solches Ergebnis gegenüber FCA nur in 11,1% (n=16) der Isolate vor. Eine direkte Übereinstimmung der MHK-Ergebnisse beider Testsysteme gab es gegenüber APH für vier (2,8%) und gegenüber FCA für 14 Isolate (9,7%). Deutlich höher lag die Übereinstimmung im Bereich ± 1 bzw. ± 2 Konzentrationsstufen bei FCA mit 50,7% (n=73) bzw. 88,2% (n=127) als bei APH mit 22,2% (n=32) bzw. 66,7% (n=96). Bei der Analyse auf der Basis der einzelnen Isolate ergab sich für keines der beiden Antimykotika eine signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen der beiden Testmethoden.

Die Ergebnisse im E-Test lagen bei Verwendung des Antibiotika-Medium 3 (AM3) gegenüber denen auf YST für die *C.albicans*-Isolate im Schwankungsbereich der Methode und waren somit als gleich zu bewerten. Bei den anderen getesteten Hefe-Arten traten teils Art bezogene Differenzen auf.

In einem zweiten Schritt wurde modellhaft untersucht, ob die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung in bzw. auf RPMI₁₆₄₀-Medium (RPMI-E), dem Medium des CLSI-M 27A2 Standardprotokolls, mit denen des YST-Medium vergleichbar sind.

An einem Teilkollektiv von 58 Hefe-Isolaten (44 *C. albicans* und zwölf andere *Candida*-Isolate sowie zwei *Trichosporon mucoides*-Stämme) erfolgte mittels Paralleltestung aus dem gleichen Inokulum in den Medien YST, RPMI-E, RPMI-S und RPMI-MB die MHK-Bestimmung, um eine Einflussnahme der Testmethode, des Nährmediums, des Puffersystems sowie der Zugabe von Methyleneblau (0,5mg/l) auf die MHK von APH und FCA modellhaft abzuklären. Alle Medien besaßen eine Glucose-Endkonzentration von 2mg/l.

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die MHK-Werte visuell abgelesen und anhand der Antimykotika-spezifischen Breakpoints in die Empfindlichkeitsklassen „sensibel“ (S), „intermediär“ (I) und „resistent“ (R) klassifiziert. Die Auswertungen erfolgten überwiegend auf der Basis einer Isolat-bezogenen SIR-Empfindlichkeitsmuster-Analyse (EMA). Als minor-Differenzen wurden Abweichungen von \pm einer Empfindlichkeitsklasse (SI, IS, IR, RI) bezeichnet. Im Gegensatz zu den major-Differenzen (SR, RS) lagen sie im Schwankungsbereich der Methoden.

Bei einem Vergleich der beiden Nährmedien YST und RPMI-E anhand der E-Test-Ergebnisse nach 48 Stunden gegenüber Amphotericin B, fand sich mittels einer Isolat-bezogenen SIR-EMA eine Übereinstimmung der SIR-Ergebnisse von 89,6% (52 von 58 Isolaten) sowie keine major-Differenzen. Mit 42 von 44 (95,5%) *C.albicans*-Isolaten lag der Anteil der Übereinstimmung höher als bei den non-*C.albicans* Arten mit 8 von 12 Hefen (66,7%).

Im Mikrodilutionstest lagen beim Vergleich der Ergebnisse gegenüber Amphotericin B in den Medien YST und RPMI-E die Anzahl der Übereinstimmungen mit 42 von 58 (72,4%) niedriger. Hier wiesen die *C.albicans*-Isolate mit 30 von 44 (68,2%) Isolaten eine geringere Über-

einstimmung gegenüber den non-*C.albicans* Hefen mit 10 von 12 Stämmen auf. Von den übereinstimmenden Isolaten waren 38 der 42 resistent. Die vier major Differenzen verteilten sich auf beide möglichen Empfindlichkeitsmuster (SR und RS).

Beim Vergleich der Ergebnisse beider Medien anhand der SIR-Werte gegenüber Fluconazol im Mikrodilutionstest fand sich zwar mit 66,7% (39 von 58 Isolaten) eine annähernd gleiche Übereinstimmung wie in der Untersuchung gegenüber Amphotericin B, doch lag sie hier im sensiblen Anteil (36 von 39 Hefen). Bei den 15 (25,9%) major-Differenzen waren alle Isolate in YST sensibel und in RPMI-E resistent.

Durch die Paralleltestung in RPMI-S und RPMI-MB gemeinsam mit YST und RPMI-E aus einem Inokulumansatz war es möglich, die Einflussnahme des Nährmediums, (RPMI-S vs. YST), des Puffersystems (RPMI-S mit Phosphatpuffer nach Sørensen vs. RPMI-MB mit MOPS) sowie der Zugabe von Methylenblau (RPMI-E ohne Methylenblau vs. RPMI-MB mit Methylenblau) zu analysieren, da die Medienpaare sonst jeweils identisch waren.

Bei der Analyse der major-Differenzen zeigte sich für die Antimykotika Amphotericin B und Fluconazol ein konträres Verhalten. Gemeinsam war beiden Antimykotika die Reihenfolge des Ausmaßes der Beeinflussung: Nährmedium > Puffer > Methylenblau-Zugabe. Die untersuchten Faktoren verhielten sich jedoch für Amphotericin B und Fluconazol genau konträr. So senkte z.B. der Einsatz von Phosphatpuffer den resistenten Anteil gegenüber Amphotericin B von 91,4 % auf 5,2%, erhöhte aber den resistenten Anteil gegenüber Fluconazol von 8,8% auf 42,1%.

Den größten Einfluss auf die Empfindlichkeitsverteilung der beiden Antimykotika hatte jedoch die Methode der Empfindlichkeitstestung. Im E-Test erwiesen sich die Isolate als signifikant sensibler als im Mikrodilutionstest, sowohl bei YST als auch bei RPMI-E als Medium. Eine Korrelation im Sinne einer „wenn-dann-Beziehung“ ließ sich in dieser Untersuchung nicht aufzeigen.

Für Gattungs- und Art-bezogene Unterschiede, die sich teilweise andeuteten, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Ergebnisse der Empfindlichkeitsbestimmung gegenüber Amphotericin B und Fluconazol in unterschiedlichem, teils konträren Ausmaß von der Testmethode, dem Nährmedium, dem Puffersystem und der Zugabe von Methylblau beeinflusst werden.

Ein Vergleich von Ergebnissen der antimykotischen Empfindlichkeitsbestimmung gegenüber Amphotericin B und Fluconazol sollte daher nur dann erfolgen, wenn die Methode und das Nährmedium gleich sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen auch, dass die klinische Korrelation für jede Methode der Empfindlichkeitsbestimmung individuell erstellt werden muss.

6. Tabellen-Anhang

Tabelle M 02: Art-Verteilung und Entnahme-Ort der klinischen Isolate der Testphase I – numerische Häufigkeit

Klinische Isolate	MR-Bereich			Andere						Total	
	Mund-Abstriche	Rachen-Abstriche	Sputum	Blutkultur	Bronchio-Pulmonal	Abdominal-Abstriche	Stuhl	Cervix	Urin		
<i>C. albicans</i>	15	73	1		1	1				91	
<i>C.</i>	1	2			1					4	
<i>C. glabrata</i>	5	4			1	1				11	
<i>C. kefyr</i>	1	1			1					3	
<i>C. krusei</i>	1	2							1	4	
<i>C. lusitaniae</i>			2		1			1		4	
<i>C.</i>		2			3					5	
<i>C.</i>	2	3								5	
<i>C.</i>		1			2					3	
<i>C. tropicalis</i>		4								4	
<i>G. capitatum</i>	1				2					3	
<i>R.</i>		1			1					2	
<i>S. cerevisiae</i>					1	1	1			3	
<i>T. mucoides</i>				1	2					3	
Total	n	26	93	3	1	16	3	1	1	1	145
	%	17,9	64,1	2,1	0,7	11,0	2,1	0,7	0,7	0,7	100

MR-Bereich = Mund- und Rachen-Bereich

Tabelle E 01b: Empfindlichkeitsverteilung der klinischen Isolate gegenüber Amphotericin B nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden unter Anwendung unterschiedlicher Testverfahren (E-Test und Mikrodilution)

Kollektiv	Test		sensibel					intermediär	resistent			Total
			0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	>2	
<i>C. albicans</i>	E-Test	n	0	10	38	37	5	1	0	0	0	91
		%	0,0	11,0	41,8	40,7	5,5	1,1	0,0	0,0	0	100,0
		kum%	0,0	11,0	52,7	93,4	98,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	MDT	n	0	0	0	0	3	55	32	0	0	90
		%	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	61,1	35,6	0,0	0	100,0
		kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	64,4	100,0	100,0	100,0	100,0
non - <i>C. albicans</i>	E-Test	n	0	3	2	9	17	3	2	4	0	40
		%	0,0	7,5	5,0	22,5	42,5	7,5	5,0	10,0	0	100,0
		kum%	0,0	7,5	12,5	35,0	77,5	85,0	90,0	100,0	100,0	100,0
	MDT	n	0	0	0	0	1	10	19	7	0	37
		%	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7	27,0	51,4	18,9	0	100,0
		kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7	29,7	81,1	100,0	100,0	100,0
non – <i>Candida</i>	E-Test	n	2	1	1	1	1	3	0	0	0	9
		%	22,2	11,1	11,1	11,1	11,1	33,3	0,0	0,0	0	100,0
		kum%	22,2	33,3	44,4	55,6	66,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	MDT	n	0	0	0	0	2	3	1	2	0	8
		%	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	37,5	12,5	25,0	0	100,0
		kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	62,5	75,0	100,0	100,0	100,0
Total	E-Test	n	2	14	41	47	23	7	2	4	0	140
		%	1,4	10,0	29,3	33,6	16,4	5,0	1,4	2,9	0	100,0
		kum%	1,4	11,4	40,7	74,3	90,7	95,7	97,1	100,0	100,0	100,0
	MDT	n	0	0	0	0	6	68	52	9	0	135
		%	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	50,4	38,5	6,7	0	100,0
		kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	54,8	93,3	100,0	100,0	100,0

kum%= kumulierende Prozentzahl

Tabelle E 02b: Empfindlichkeitsverteilung der klinischen Isolate gegenüber Amphotericin B nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unter Anwendung unterschiedlicher Testverfahren (E-Test und Mikrodilution)

Kollektiv		sensibel					intermediär	resistent					Total
Test		0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	>32	
C. albicans													
E-Test	n	0	1	1	35	51	2	0	0	0	0	1	91
	%	0,0	1,1	1,1	38,5	56,0	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	100,0
	kum%	0,0	1,1	2,2	40,7	96,7	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	100,0	100,0
MDT	n	0	0	0	0	0	5	81	5	0	0	0	91
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,5	89,0	5,5	0,0	0,0	0,0	100,0
	kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,5	94,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
non - C. albicans													
E-Test	n	0	2	1	3	10	19	2	4	0	2	0	43
	%	0,0	4,7	2,3	7,0	23,3	44,2	4,7	9,3	0,0	4,7	0,0	100,0
	kum%	0,0	4,7	7,0	14,0	37,2	81,4	86,0	95,3	95,3	100,0	100,0	100,0
MDT	n	0	0	0	0	1	9	19	12	2	0	0	43
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	20,9	44,2	27,9	4,7	0,0	0,0	100,0
	kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	23,3	67,4	95,3	100,0	100,0	100,0	100,0
non - Candida													
E-Test	n	1	1	2	0	1	4	1	1	0	0	0	11
	%	9,1	9,1	18,2	0,0	9,1	36,4	9,1	9,1	0,0	0,0	0,0	100,0
	kum%	9,1	18,2	36,4	36,4	45,5	81,8	90,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
MDT	n	0	0	0	0	0	3	4	2	1	0	0	10
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	40,0	20,0	10,0	0,0	0,0	100,0
	kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	70,0	90,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Gesamtkollektiv													
E-Test	n	1	4	4	38	62	25	3	5	0	2	1	145
	%	0,7	2,8	2,8	26,2	42,8	17,2	2,1	3,4	0,0	1,4	0,7	100,0
	kum%	0,7	3,4	6,2	32,4	75,2	92,4	94,5	97,9	97,9	99,3	100,0	100,0
MDT	n	0	0	0	0	1	17	104	19	3	0	0	144
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	11,8	72,2	13,2	2,1	0,0	0,0	100,0
	kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	12,5	84,7	97,9	100,0	100,0	100,0	100,0
kum%= kumulierende Prozentzahl													

Tabelle E 04b: Empfindlichkeitsverteilung des Gesamtkollektivs der klinischen Isolate gegenüber Fluconazol unter Anwendung unterschiedlicher Testverfahren (E-Test und Mikrodilution)

		sensibel										intermediär		resistent			Total
		<0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	
Inkubationszeit		24 Stunden															
E-Test	n	1	0	2	3	33	57	19	9	6	1	0	7	1	0	1	140
	%	0,7	0,0	1,4	2,1	23,6	40,7	13,6	6,4	4,3	0,7	0,0	5,0	0,7	0,0	0,7	100,0
	kum%	0,7	0,7	2,1	4,3	27,9	68,6	82,1	88,6	92,9	93,6	93,6	98,6	99,3	99,3	100,0	100,0
MDT	n	0	0	0	0	0	0	95	14	11	5	3	0	7	1	0	136
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	69,9	10,3	8,1	3,7	2,2	0,0	5,1	0,7	0,0	100,0
	kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	69,9	80,1	88,2	91,9	94,1	94,1	99,3	100,0	100,0	100,0
Inkubationszeit		48 Stunden															
E-Test	n	1	1	2	2	22	59	23	8	9	4	3	2	5	1	3	145
	%	0,7	0,7	1,4	1,4	15,2	40,7	15,9	5,5	6,2	2,8	2,1	1,4	3,4	0,7	2,1	100,0
	kum%	0,7	1,4	2,8	4,1	19,3	60,0	75,9	81,4	87,6	90,3	92,4	93,8	97,2	97,9	100,0	100,0
MDT	n	0	0	0	0	0	0	72	24	18	9	7	2	2	8	2	144
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	16,7	12,5	6,3	4,9	1,4	1,4	5,6	1,4	100,0
	kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	66,7	79,2	85,4	90,3	91,7	93,1	98,6	100,0	100,0

kum%= kumulierende Prozentzahl

Tabelle E 07b: Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämmen gegenüber Amphotericin B in Abhängigkeit von der Testmethode

APHYST			sensibel					intermediär	resistent		Total
Inkubationszeit (Std.)	Test		0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	
24	E-Test	n	1	1	4	8	7	5	0	0	26
		%	3,8	3,8	15,4	30,8	26,9	19,2	0,0	0,0	100,0
		kum%	3,8	7,7	23,1	53,8	80,8	100,0	100,0	100,0	100,0
	MDT	n	0	0	0	0	1	10	11	3	25
		%	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	40,0	44,0	12,0	100,0
		kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	44,0	88,0	100,0	100,0
48	E-Test	n	0	2	1	3	11	6	6	0	29
		%	0,0	6,9	3,4	10,3	37,9	20,7	20,7	0,0	100,0
		kum%	0,0	6,9	10,3	20,7	58,6	79,3	100,0	100,0	100,0
	MDT	n	0	0	0	0	0	2	16	8	26
		%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,7	61,5	30,8	100,0
		kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,7	69,2	100,0	100,0

Kum%= kumulierende Prozentzahl

Tabelle E 08b: Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämme gegenüber Fluconazol in Abhängigkeit von der Testmethode

FCA/YST			sensibel					intermediär		resistent	Total
Inkubationszeit	Test		0,5	1	2	4	8	16	32	64	
24	E-Test	n	8	7	6	2	0	0	3	0	26
		%	30,8	26,9	23,1	7,7	0,0	0,0	11,5	0,0	100,0
		kum%	30,8	57,7	80,8	88,5	88,5	88,5	100,0	100,0	100,0
	MDT	n	0	6	6	7	4	0	1	1	25
		%	0,0	24,0	24,0	28,0	16,0	0,0	4,0	4,0	100,0
		kum%	0,0	24,0	48,0	76,0	92,0	92,0	96,0	100,0	100,0
48	E-Test	n	5	7	4	5	5	0	0	3	29
		%	17,2	24,1	13,8	17,2	17,2	0,0	0,0	10,3	100,0
		kum%	17,2	41,4	55,2	72,4	89,7	89,7	89,7	100,0	100,0
	MDT	n	0	2	6	9	2	3	1	3	26
		%	0,0	7,7	23,1	34,6	7,7	11,5	3,8	11,5	100,0
		kum%	0,0	7,7	30,8	65,4	73,1	84,6	88,5	100,0	100,0

kum%= kumulierende Prozentzahl

Tabelle E 09b: Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämme gegenüber Voriconazol in Abhängigkeit von der Testmethode

		sensibel								intermediär	resistent	Total
		0,004	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
Inkubationszeit		24 Stunden										
E-Test	n	0	4	12	6	2	2	0	0	0	0	26
	%	0,0	15,4	46,2	23,1	7,7	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	kum%	0,0	15,4	61,5	84,6	92,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
MDT	n	0	0	0	10	5	7	1	2	0	0	25
	%	0,0	0,0	0,0	40,0	20,0	28,0	4,0	8,0	0,0	0,0	100,0
	kum%	0,0	0,0	0,0	40,0	60,0	88,0	92,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Inkubationszeit		48 Stunden										
E-Test	n	1	5	6	4	8	5	0	0	0	0	29
	%	3,4	17,2	20,7	13,8	27,6	17,2	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	kum%	3,4	20,7	41,4	55,2	82,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
MDT	n	0	0	0	8	2	3	7	0	5	1	26
	%	0,0	0,0	0,0	30,8	7,7	11,5	26,9	0,0	19,2	3,8	100,0
	kum%	0,0	0,0	0,0	30,8	38,5	50,0	76,9	76,9	96,2	100,0	100,0

kum%= kumulierende Prozentzahl

Tabelle E 10b: Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämme gegenüber Flucytosin
in Abhängigkeit von der Testmethode

		sensibel											inter- mediär	resistent		Total
		0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	32	>32	
Inkubationszeit		24 Stunden														
E-Test	n	0	1	2	1	6	4	2	2	2	0	0	0	0	6	26
	%	0,0	3,8	7,7	3,8	23,1	15,4	7,7	7,7	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	23,1	100
	kum%	0,0	3,8	11,5	15,4	38,5	53,8	61,5	69,2	76,9	76,9	76,9	76,9	76,9	100	100
MDT	n	0	0	0	0	0	0	0	16	3	0	0	1	2	3	25
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	64,0	12,0	0,0	0,0	4,0	8,0	12,0	100
	kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	64,0	76,0	76,0	76,0	80,0	88,0	100	100
Inkubationszeit		48 Stunden														
E-Test	n	1	0	1	1	2	6	2	3	2	1	0	0	1	9	29
	%	3,4	0,0	3,4	3,4	6,9	20,7	6,9	10,3	6,9	3,4	0,0	0,0	3,4	31,0	100
	kum%	3,4	3,4	6,9	10,3	17,2	37,9	44,8	55,2	62,1	65,5	65,5	65,5	69,0	100	100
MDT	n	0	0	0	0	0	0	0	11	2	3	2	1	4	3	26
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,3	7,7	11,5	7,7	3,8	15,4	11,5	100
	kum%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,3	50,0	61,5	69,2	73,1	88,5	100	100

kum%= kumulierende Prozentzahl

Tabelle E 11b: Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämme gegenüber Itraconazol
in Abhängigkeit von der Testmethode

Inkubationszeit (Std.)	Test		sensibel				intermediär	resistent				Total
			≤0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	>4	
24	E-Test	n	4	5	2	5	3	5	0	2	0	26
		%	15,4	19,2	7,7	19,2	11,5	19,2	0,0	7,7	0,0	100,0
		kum%	15,4	34,6	42,3	61,5	73,1	92,3	92,3	100,0	100,0	100,0
	MDT	n	10	4	4	4	2	1	0	0	0	25
		%	40,0	16,0	16,0	16,0	8,0	4,0	0,0	0,0	0,0	100,0
48	E-Test	n	2	6	2	5	2	4	3	2	3	29
		%	6,9	20,7	6,9	17,2	6,9	13,8	10,3	6,9	10,3	100,0
		kum%	6,9	27,6	34,5	51,7	58,6	72,4	82,8	89,7	100,0	100,0
	MDT	n	4	4	5	2	3	7	1	0	0	26
		%	15,4	15,4	19,2	7,7	11,5	26,9	3,8	0,0	0,0	100,0
kum%	15,4	30,8	50,0	57,7	69,2	96,2	100,0	100,0	100,0	100,0		

kum%= kumulierende Prozentzahl

Tabelle E 12b: Empfindlichkeitsverteilung des Gesamt- und der einzelnen Subkollektive der klinischen Isolate im E-Test in Abhängigkeit des verwendeten Mediums (YST und AM3) - numerische Häufigkeit und Prozentverteilung (Inkubationszeit: 24 Stunden)

1. Teil: sensibler Konzentrationsbereich

Medium		sensibel													
		<0,002	0,004	0,006	0,008	0,012	0,016	0,023	0,032	0,047	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25
		Total													
AM3	Anzahl	3	1	0	1	0	5	4	15	19	39	31	10	4	5
	%	2,1	0,7	0	0,7	0	3,5	2,8	10,5	13,3	27,3	21,7	7	2,8	3,5
	kum %	2,1	2,8	2,8	3,5	3,5	7	9,8	20,3	33,6	60,8	82,5	89,5	92,3	95,8
YST	Anzahl	0	0	0	0	1	1	4	10	17	24	29	18	12	11
	%	0	0	0	0	0,7	0,7	2,9	7,1	12,1	17,1	20,7	12,9	8,6	7,9
	kum %	0	0	0	0	0,7	1,4	4,3	11,4	23,5	40,6	61,3	74,2	82,8	90,7
		<i>C. albicans</i>													
AM3	Anzahl	0	1	0	1	0	1	0	4	14	34	29	6	0	0
	%	0	1,1	0	1,1	0	1,1	0	4,4	15,4	37,4	31,9	6,6	0	0
	kum %	0	1,1	1,1	2,2	2,2	3,3	3,3	7,7	23,1	60,4	92,3	98,9	98,9	98,9
YST	Anzahl	0	0	0	0	0	0	3	7	15	23	24	13	5	0
	%	0	0	0	0	0	0	3,3	7,7	16,5	25,3	26,4	14,3	5,5	0
	kum %	0	0	0	0	0	0	3,3	11	27,5	52,7	79,1	93,4	98,9	98,9
		Non- <i>C. albicans</i>													
AM3	Anzahl	2	0	0	0	0	4	4	6	4	4	2	4	4	4
	%	4,8	0	0	0	0	9,5	9,5	14,3	9,5	9,5	4,8	9,5	9,5	9,5
	kum %	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	14,3	23,8	38,1	47,6	57,1	61,9	71,4	81	90,5
YST	Anzahl	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	5	4	7	10
	%	0	0	0	0	0	0	2,5	5	5	0	12,5	10	17,5	25
	kum %	0	0	0	0	0	0	2,5	7,5	12,5	12,5	25	35	52,5	77,5
		Non- <i>Candida</i>													
AM3	Anzahl	1	0	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0	1
	%	10	0	0	0	0	0	0	50	10	10	0	0	0	10
	kum %	10	10	10	10	10	10	10	60	70	80	80	80	80	90
YST	Anzahl	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
	%	0	0	0	0	11,1	11,1	0	11,1	0	11,1	0	11,1	0	11,1
	kum %	0	0	0	0	11,1	22,2	22,2	33,3	33,3	44,4	44,4	55,6	55,6	66,7

kum%= kumulierende Prozentzahl

2. Teil: intermediärer und resistenter Konzentrationsbereich

Medium		intermediär			resistent				Total
		0,38	0,5	0,75	1	1,5	2	>32	
Total									
AM3	Anzahl	1	2	0	0	2	0	1	140
	%	0,7	1,4	0	0	1,4	0	0,7	100
	kum %	96,5	97,9	97,9	97,9	99,3	99,3	100	100
YST	Anzahl	4	3	1	1	4	0	0	140
	%	2,9	2,1	0,7	0,7	2,9	0	0	100
	kum %	93,6	95,7	96,4	97,1	100	100	100	100
<i>C. albicans</i>									
AM3	Anzahl	0	0	0	0	0	0	1	91
	%	0	0	0	0	0	0	1,1	100
	kum %	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	100	100
YST	Anzahl	0	1	0	0	0	0	0	91
	%	0	1,1	0	0	0	0	0	100
	kum %	98,9	100	100	100	100	100	100	100
Non- <i>C. albicans</i>									
AM3	Anzahl	0	2	0	0	2	0	0	42
	%	0	4,8	0	0	4,8	0	0	100
	kum %	90,5	95,2	95,2	95,2	100	100	100	100
YST	Anzahl	2	1	1	1	4	0	0	40
	%	5	2,5	2,5	2,5	10	0	0	100
	kum %	82,5	85	87,5	90	100	100	100	100
Non- <i>Candida</i>									
AM3	Anzahl	1	0	0	0	0	0	0	10
	%	10	0	0	0	0	0	0	100
	kum %	100	100	100	100	100	100	100	100
YST	Anzahl	2	1	0	0	0	0	0	9
	%	22,2	11,1	0	0	0	0	0	100
	kum %	88,9	100	100	100	100	100	100	100

kum%= kumulierende Prozentzahl

Tabelle E 13b: Empfindlichkeitsverteilung des Gesamt- und der einzelnen Subkollektive der klinischen Isolate im E-Test in Abhängigkeit des verwendeten Mediums (YST und AM3) - numerische Häufigkeit und Prozentverteilung (Inkubationszeit: 48 Stunden)

1. Teil: sensibler Konzentrationsbereich

Medium		sensibel										
		<0,002	0,008	0,016	0,023	0,032	0,047	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25
		Total										
YST	n	0	0	1	2	2	1	3	11	27	39	23
	%	0	0	0,7	1,4	1,4	0,7	2,1	7,6	18,6	26,9	15,9
	kum%	0	0	0,7	2,1	3,4	4,1	6,2	13,8	32,4	59,3	75,2
AM3	n	3	1	0	1	1	9	24	40	42	6	6
	%	2,1	0,7	0	0,7	0,7	6,2	16,6	27,6	29	4,1	4,1
	kum%	2,1	2,8	2,8	3,4	4,1	10,3	26,9	54,5	83,4	87,6	91,7
		<i>C. albicans</i>										
YST	n	0	0	0	0	1	0	1	10	25	36	15
	%	0	0	0	0	1,1	0	1,1	11	27,5	39,6	16,5
	kum%	0	0	0	0	1,1	1,1	2,2	13,2	40,7	80,2	96,7
AM3	n	0	1	0	0	0	5	13	34	33	4	0
	%	0	1,1	0	0	0	5,5	14,3	37,4	36,3	4,4	0
	kum%	0	1,1	1,1	1,1	1,1	6,6	20,9	58,2	94,5	98,9	98,9
		non- <i>C. albicans</i>										
YST	n	0	0	0	1	1	1	0	1	2	2	8
	%	0	0	0	2,3	2,3	2,3	0	2,3	4,7	4,7	18,6
	kum%	0	0	0	2,3	4,7	7	7	9,3	14	18,6	37,2
AM3	n	2	0	0	1	1	1	9	5	8	2	6
	%	4,7	0	0	2,3	2,3	2,3	20,9	11,6	18,6	4,7	14
	kum%	4,7	4,7	4,7	7	9,3	11,6	32,6	44,2	62,8	67,4	81,4
		non- <i>Candida</i>										
YST	n	0	0	1	1	0	0	2	0	0	1	0
	%	0	0	9,1	9,1	0	0	18,2	0	0	9,1	0
	kum%	0	0	9,1	18,2	18,2	18,2	36,4	36,4	36,4	45,5	45,5
AM3	n	1	0	0	0	0	3	2	1	1	0	0
	%	9,1	0	0	0	0	27,3	18,2	9,1	9,1	0	0
	kum%	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	36,4	54,5	63,6	72,7	72,7	72,7

kum%= kumulierende Prozentzahl

2. Teil: intermediärer und resistenter Konzentrationsbereich

Medium		intermediär			resistent						Total
		0,38	0,5	0,75	1	1,5	2	3	8	>32	
		Total									
YST	n	15	10	1	2	2	3	1	1	1	145
	%	10,3	6,9	0,7	1,4	1,4	2,1	0,7	0,7	0,7	100
	kum%	85,5	92,4	93,1	94,5	95,9	97,9	98,6	99,3	100	100
AM3	n	6	2	0	0	1	2	0	0	1	145
	%	4,1	1,4	0	0	0,7	1,4	0	0	0,7	100
	kum%	95,9	97,2	97,2	97,2	97,9	99,3	99,3	99,3	100	100
		<i>C. albicans</i>									
YST	n	2	0	0	0	0	0	0	0	1	91
	%	2,2	0	0	0	0	0	0	0	1,1	100
	kum%	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	100	100
AM3	n	0	0	0	0	0	0	0	0	1	91
	%	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1	100
	kum%	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	100	100
		<i>non-C. albicans</i>									
YST	n	12	7	1	1	1	3	1	1	0	43
	%	27,9	16,3	2,3	2,3	2,3	7	2,3	2,3	0	100
	kum%	65,1	81,4	83,7	86	88,4	95,3	97,7	100	100	100
AM3	n	3	2	0	0	1	2	0	0	0	43
	%	7	4,7	0	0	2,3	4,7	0	0	0	100
	kum%	88,4	93	93	93	95,3	100	100	100	100	100
		<i>non-Candida</i>									
YST	n	1	3	0	1	1	0	0	0	0	11
	%	9,1	27,3	0	9,1	9,1	0	0	0	0	100
	kum%	54,5	81,8	81,8	90,9	100	100	100	100	100	100
AM3	n	3	0	0	0	0	0	0	0	0	11
	%	27,3	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	kum%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

kum%= kumulierende Prozentzahl

Tabelle E 16b: Empfindlichkeitsverteilung des Gesamtkollektivs an klinischen Isolaten gegenüber Amphotericin B in Abhängigkeit der unterschiedlichen Medien (RPMI-E, RPMI-S, RPMI-MB, YST) im E-Test (Inkubationszeit: 24 Std.)

Medium	sensibel												intermediär		resistent		Total
	0,006	0,008	0,012	0,016	0,023	0,032	0,047	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,5	1	2	
RPMI-E																	
N	0	4	1	11	7	13	9	3	4	2	2	1	2	0	0	0	59
%	0,0	6,8	1,7	18,6	11,9	22,0	15,3	5,1	6,8	3,4	3,4	1,7	3,4	0,0	0,0	0,0	100
kum%	0,0	6,8	8,5	27,1	39,0	61,0	76,3	81,4	88,1	91,5	94,9	96,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100
RPMI-S																	
N	0	1	1	1	15	16	13	6	2	2	0	1	0	0	1	0	59
%	0,0	1,7	1,7	1,7	25,4	27,1	22,0	10,2	3,4	3,4	0,0	1,7	0,0	0,0	1,7	0,0	100
kum%	0,0	1,7	3,4	5,1	30,5	57,6	79,7	89,8	93,2	96,6	96,6	98,3	98,3	98,3	100,0	100,0	100
RPMI-MB																	
N	1	1	4	8	13	11	8	1	7	2	1	1	1	0	0	0	59
%	1,7	1,7	6,8	13,6	22,0	18,6	13,6	1,7	11,9	3,4	1,7	1,7	1,7	0,0	0,0	0,0	100
kum%	1,7	3,4	10,2	23,7	45,8	64,4	78,0	79,7	91,5	94,9	96,6	98,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100
YST																	
N	1	0	0	2	1	8	9	16	8	2	6	2	1	1	0	2	59
%	1,7	0,0	0,0	3,4	1,7	13,6	15,3	27,1	13,6	3,4	10,2	3,4	1,7	1,7	0,0	3,4	100
kum%	1,7	1,7	1,7	5,1	6,8	20,3	35,6	62,7	76,3	79,7	89,8	93,2	94,9	96,6	96,6	100,0	100

kum%= kumulierende Prozentzahl

Tabelle E 17b: Empfindlichkeitsverteilung des Gesamtkollektivs an klinischen Isolaten gegenüber Amphotericin B in Abhängigkeit der unterschiedlichen Medien (RPMI-E, RPMI-S, RPMI-MB, YST) im E-Test (Inkubationszeit: 48 Std.)

Medium	sensibel										intermediär			resistent					Total
	0,008	0,016	0,023	0,032	0,047	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,5	0,75	1	1,5	2	3	4	
RPMI-E																			
N	1	0	1	5	12	12	10	6	3	4	2	0	0	2	1	0	0	0	59
%	1,7	0,0	1,7	8,5	20,3	20,3	16,9	10,2	5,1	6,8	3,4	0,0	0,0	3,4	1,7	0	0	0	100
kum%	1,7	0,0	3,4	11,9	32,2	52,5	69,5	79,7	84,7	91,5	94,9	94,9	94,9	98,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100
RPMI-S																			
N	0	1	0	6	10	12	14	12	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	59
%	0,0	1,7	0	10,2	16,9	20,3	23,7	20,3	1,7	3,4	0	0	0	1,7	0	0	0	0	100,0
kum%	0,0	1,7	1,7	11,9	28,8	49,2	72,9	93,2	94,9	98,3	98,3	98,3	98,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
RPMI-MB																			
N	0	1	0	1	0	7	12	17	11	3	3	0	1	1	1	0	0	1	59
%	0,0	1,7	0	1,7	0	11,9	20,3	28,8	18,6	5,1	5,1	0	1,7	1,7	1,7	0	0	1,7	100
kum%	0,0	1,7	0	3,4	0	15,3	35,6	64,4	83,1	88,1	93,2	93,2	94,9	96,6	98,3	98,3	98,3	100,0	100
YST																			
N	0	0	1	0	0	2	2	20	15	9	3	3	3	0	0	1	1	0	60
%	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	3,3	3,3	33,3	25,0	15,0	5,0	5,0	5,0	0,0	0,0	1,7	1,7	0	100
kum%	0,0	0,0	1,7	1,7	1,7	5,0	8,3	41,7	66,7	81,7	86,7	91,7	96,7	96,7	96,7	98,3	100,0	100,0	100

kum% = kumulierte Prozentzahl

Tabelle E 19b: Empfindlichkeitsverteilung des Gesamtkollektivs an klinischen Isolaten gegenüber Amphotericin B in Abhängigkeit der unterschiedlichen Medien (RPMI-E, RPMI-S, RPMI-MB, YST) in der Mikrodilution (Inkubationszeit: 24 Std.)

Medium		sensibel			intermediär	resistent			Total
		0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
RPMI-E	n	2	2	2	33	19	0	0	58
	%	3,4	3,4	3,4	56,9	32,8	0,0	0,0	100,0
	kum%	3,4	6,9	10,3	67,2	100,0	100,0	100,0	100,0
RPMI-S	n	0	0	43	12	1	0	0	56
	%	0,0	0,0	76,8	21,4	1,8	0,0	0,0	100,0
	kum%	0,0	0,0	76,8	98,2	100,0	100,0	100,0	100,0
RPMI-MB	n	0	0	2	29	25	2	0	58
	%	0,0	0,0	3,4	50,0	43,1	3,4	0,0	100,0
	kum%	0,0	0,0	3,4	53,4	96,6	100,0	100,0	100,0
YST	n	0	0	0	22	31	5	0	58
	%	0,0	0,0	0,0	37,9	53,4	8,6	0,0	100,0
	kum%	0,0	0,0	0,0	37,9	91,4	100,0	100,0	100,0

kum% = kumulierte Prozentzahl

Tabelle E 19c: Empfindlichkeitsverteilung des Gesamtkollektivs an klinischen Isolaten gegenüber Fluconazol in Abhängigkeit der unterschiedlichen Medien (RPMI-E, RPMI-S, RPMI-MB, YST) in der Mikrodilution (Inkubationszeit: 24 Std.)

Medium		sensibel					intermediär		resistent		Total
		0,063	1	2	4	8	16	32	64	>128	
RPMI-E	n	1	42	1	2	3	2	1	1	5	58
	%	1,7	72,4	1,7	3,4	5,2	3,4	1,7	1,7	8,6	100,0
	kum%	1,7	74,1	75,9	79,3	84,5	87,9	89,7	91,4	100,0	100,0
RPMI-S	n	0	14	19	6	6	1	3	2	5	56
	%	0,0	25,0	33,9	10,7	10,7	1,8	5,4	3,6	8,9	100,0
	kum%	0,0	25,0	58,9	69,6	80,4	82,1	87,5	91,1	100,0	100,0
RPMI-MB	n	0	46	3	1	3	3	1	1	0	58
	%	0,0	79,3	5,2	1,7	5,2	5,2	1,7	1,7	0,0	100,0
	kum%	0,0	79,3	84,5	86,2	91,4	96,6	98,3	100,0	100,0	100,0
YST	n	0	42	2	5	5	2	0	2	0	58
	%	0,0	72,4	3,4	8,6	8,6	3,4	0,0	3,4	0,0	100,0
	kum%	0,0	72,4	75,9	84,5	93,1	96,6	96,6	100,0	100,0	100,0

kum% = kumulierte Prozentzahl

Tabelle E 20b: Empfindlichkeitsverteilung des Gesamtkollektivs an klinischen Isolaten gegenüber Amphotericin B in Abhängigkeit der unterschiedlichen Medien (RPMI-E, RPMI-S, RPMI-MB, YST) in der Mikrodilution (Inkubationszeit: 48 Std.)

Medium		sensibel		intermediär	resistent			Total
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	
RPMI-E	n	2	1	14	33	8	0	58
	%	3,4	1,7	24,1	56,9	13,8	0,0	100,0
	kum%	3,4	5,2	29,3	86,2	100,0	100,0	100,0
RPMI-S	n	0	17	38	3	0	0	58
	%	0,0	29,3	65,5	5,2	0,0	0,0	100,0
	kum%	0,0	29,3	94,8	100,0	100,0	100,0	100,0
RPMI-MB	n	0	1	4	43	10	0	58
	%	0,0	1,7	6,9	74,1	17,2	0,0	100,0
	kum%	0,0	1,7	8,6	82,8	100,0	100,0	100,0
YST	n	0	1	5	35	17	1	59
	%	0,0	1,7	8,5	59,3	28,8	1,7	100,0
	kum%	0,0	1,7	10,2	69,5	98,3	100,0	100,0

kum% = kumulierte Prozentzahl

Tabelle E 20c: Empfindlichkeitsverteilung des Gesamtkollektivs an klinischen Isolaten gegenüber Fluconazol in Abhängigkeit der unterschiedlichen Medien (RPMI-E, RPMI-S, RPMI-MB, YST) in der Mikrodilution (Inkubationszeit: 48 Std.)

Medien		sensibel				intermediär		resistent			Total
		1	2	4	8	16	32	64	128	>128	
RPMI-E	n	32	3	2	2	1	1	2	0	15	58
	%	55,2	5,2	3,4	3,4	1,7	1,7	3,4	0,0	25,9	100,0
	kum%	55,2	60,3	63,8	67,2	69,0	70,7	74,1	74,1	100,0	100,0
RPMI-S	n	8	9	2	5	5	4	2	2	20	57
	%	14,0	15,8	3,5	8,8	8,8	7,0	3,5	3,5	35,1	100,0
	kum%	14,0	29,8	33,3	42,1	50,9	57,9	61,4	64,9	100,0	100,0
RPMI-MB	n	40	6	1	1	4	1	0	2	3	58
	%	69,0	10,3	1,7	1,7	6,9	1,7	0,0	3,4	5,2	100,0
	kum%	69,0	79,3	81,0	82,8	89,7	91,4	91,4	94,8	100,0	100,0
YST	n	31	10	3	8	4	1	1	1	0	59
	%	52,5	16,9	5,1	13,6	6,8	1,7	1,7	1,7	0	100,0
	kum%	52,5	69,5	74,6	88,1	94,9	96,6	98,3	100,0	100,0	100,0

kum% = kumulierte Prozentzahl

Tabelle E 32: SIR-Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämme gegenüber unterschiedlichen Antimykotika auf verschiedenen Nährmedien
(Inkubationszeit: 24 Std)

Medium		Itraconazol				Fluconazol				Voriconazol			
		S	I	R	Total	S	I	R	Total	S	I	R	Total
RPMI-E	n	11	3	2	16	12	4	0	16	14	2	0	16
	%	68,8	18,8	12,5	100,0	75,0	25,0	0,0	100,0	87,5	12,5	0,0	100,0
RPMI-S	n	10	1	1	12	8	3	1	12	12	0	0	12
	%	83,3	8,3	8,3	100,0	66,7	25,0	8,3	100,0	100,0	0,0	0,0	100,0
RPMI-MB	n	10	3	3	16	13	3	0	16	16	0	0	16
	%	62,5	18,8	18,8	100,0	81,3	18,8	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	100,0
YST	n	13	2	1	16	13	2	1	16	16	0	0	16
	%	81,3	12,5	6,3	100,0	81,3	12,5	6,3	100,0	100,0	0,0	0,0	100,0

Medium		Flucytosin				Amphotericin			
		S	I	R	Total	S	I	R	Total
RPMI-E	n	11	2	3	16	1	7	8	16
	%	68,8	12,5	18,8	100,0	6,3	43,8	50,0	100,0
RPMI-S	n	7	2	3	12	8	3	1	12
	%	58,3	16,7	25,0	100,0	66,7	25,0	8,3	100,0
RPMI-MB	n	11	0	5	16	1	2	13	16
	%	68,8	0,0	31,3	100,0	6,3	12,5	81,3	100,0
YST	n	11	0	5	16	0	4	12	16
	%	68,8	0,0	31,3	100,0	0,0	25,0	75,0	100,0

Tabelle E 33: SIR-Empfindlichkeitsverteilung der Kontrollstämme gegenüber unterschiedlichen Antimykotika auf verschiedenen Nährmedien (Inkubationszeit: 48 Std.)

		Itraconazol				Fluconazol				Voriconazol			
		S	I	R	Total	S	I	R	Total	S	I	R	Total
RPMI-E	n	2	3	11	16	6	5	5	16	10	1	5	16
	%	12,5	18,8	68,8	100,0	37,5	31,3	31,3	100,0	62,5	6,3	31,3	100,0
RPMI-S	n	12	0	2	14	7	5	2	14	13	0	1	14
	%	85,7	0,0	14,3	100,0	50,0	35,7	14,3	100,0	92,9	0,0	7,1	100,0
RPMI-MB	n	5	3	8	16	9	3	3	16	13	0	3	16
	%	31,3	18,8	50,0	100,0	56,3	18,8	18,8	100,0	81,3	0,0	18,8	100,0
YST	n	6	5	5	16	12	2	2	16	14	2	0	16
	%	37,5	31,3	31,3	100,0	75,0	12,5	12,5	100,0	87,5	12,5	0,0	100,0

Medium		Flucytosin				Amphotericin			
		S	I	R	Total	S	I	R	Total
RPMI-E	n	10	3	3	16	0	0	16	16
	%	62,5	18,8	18,8	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
RPMI-S	n	7	3	4	14	6	6	2	14
	%	50,0	21,4	28,6	100,0	42,9	42,9	14,3	100,0
RPMI-MB	n	11	0	5	16	1	0	15	16
	%	68,8	0,0	31,3	100,0	6,3	0,0	93,8	100,0
YST	n	8	2	6	16	0	0	16	16
	%	50,0	12,5	37,5	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0

7. Literaturverzeichnis

1. AKPAN, A.; MORGAN, R. (2002)
Oral candidiasis.
Postgraduate Medical Journal 78, S. 455–459
2. AL-ATTAS, S.A.; AMRO, S.O. (2010)
Candidal colonization, strain diversity, and antifungal susceptibility among adult diabetic patients.
Annals of Saudi Medicine 30, S. 101-108
3. ARENDRUP, M.; LUNDGREN, B.; JENSEN, I.M.; HANSEN, B.S.; FRIMODT-MØLLER, N. (2001)
Comparison of Etest and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 47, S. 521-526
4. AXÉLL, T.; SAMARANAYAKE, L.P. ; REICHART, P.A.; OLSEN, I. (1997)
A proposal for reclassification of oral candidosis.
Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics 84, S.111-112
5. BADIEE, P.; ALBORZI A.; DAVARPANAH M.A.; SHAKIBAM, E. (2010)
Distributions and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patients.
Archives of Iranian Medicine 13, S. 282-287
6. BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. (1983)
Yeasts: Characteristics and Identification.
Cambridge University Press, Cambridge
7. BARRY, L.; PFALLER, M.A.; RENNIE, R.P.; FUCHS, P.C.; BROWN, S.D. (2002)
Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, S. 1781-1784

8. BARTIZAL, C.; ODDS, F.C. (2003)
Influences of methodological variables on susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species and *Aspergillus fumigatus*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47, S. 2100-2107
9. BLOT, S.I.; VANDEWOUDE, K.H.; HOSTE, E.A.; COLARDYN, F.A. (2002)
Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients.
The American Journal of Medicine 113, S. 480-485
10. CARTLEDGE, J.D.; MIDGLEY, J.; GAZZARD, B.G. (1999)
Non-albicans oral candidosis in HIV-positive patients.
Journal of Microbial Chemotherapy 43, S. 419-422
11. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2002)
Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, M27-A2.
Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
12. DAR-ODEH, N.S.; SHEHABI, A.A. (2003)
Oral Candidosis in patients with removable dentures.
Mycoses 46, S. 187-191
13. DARWAZEH, A.M.; HAMMAD, M.M.; AL-JAMAEI, A.A. (2010)
The relationship between oral hygiene and oral colonization with *Candida* species in healthy adult subjects.
International Journal of Dental Hygiene 8, S. 128-133
14. ELLEPOLA, A.N.; SAMARANAYAKE, L.P. (2000)
Oral candidal infections and antimycotics.
Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 11, S. 172-198
15. FARAH, C.S.; LYNCH, N.; MCCULLOUGH, M.J. (2010)
Oral fungal infections: an update for the general practitioner.
Australian Dental Journal 55, S. 48-54

16. FEGELER, W. (1982)
Epidemiologie und Pathogenese generalisierender einheimischer Mykosen in: Systemische Mykosen.
Meinhof, W; Seeliger, H; Wegemann, T; Schönfeld, H.
Hahnenklee-Symposium ed. Roche, 19-35
17. FEGELER, W.; BECKER, K.; SCHMALRECK, A.F. AND DMYKG-ANTIFUNGAL STUDY GROUP (2003)
Influence of Culture Media on the Susceptibility of *Candida* Species to Flucytosine (5FC), Amphotericin (AmB), Fluconazole (FLC), Voriconazole (VOR), and Itraconazole (ITR).
15th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Texas, USA
18. FIGUEIRAL, M.H.; AZUL, A.; PINTO, E.; FONSECA, P.A.; BRANCO, F.M.; SCULLY, C. (2007)
Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort.
Journal of Oral Rehabilitation 34; S. 448–455
19. 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.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 59, S. 767-771
20. FRASER, V.J.; JONES, M.; DUNKEL, J.; STORFER, S.; MEDOFF, G.; DUNAGAN, W.C. (1992)
Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality.
Clinical Infectious Diseases 15, S. 414-421
21. GROLL, A. H.; KOLVE, H. (2004)
Antifungal agents: in vitro susceptibility testing, pharmacodynamics, and prospects for combination therapy.
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 23, S. 256-270

22. HAMZA, O.J.; MATEE, M.I.; MOSHI, M.J.; SIMON, E.N.; MUGUSI, F.; MIKX, F.H.; HELDERMAN, W.H.; RIJS, A.J.; VAN DER VEN, A.J.; VERWEIJ, P.E. (2008)
Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis.
BMC Microbiology 8, S. 135
23. HAHN, H.; FALKE, D.; KAUFMANN, S.H.E.; ULLMANN, U. (2004)
Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.
5. vollständig aktualisierte Auflage
Springer Verlag Heidelberg, S. 853-858
24. HOF, H. (2003)
Mykologie für Mediziner
Grundlagen, Pathogenese, Manifestation, Diagnostik, Therapie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart / New York, S. 106
25. HOF, H.; DÖRRIES, R. (2005)
Medizinische Mikrobiologie, Duale Reihe
3. komplett überarbeitete und erweiterte Auflage
Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 466-467
26. KOGA-ITO, C.Y.; LYON, J.P.; DE RESENDE, M.A. (2008)
Comparison between E-test and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates.
Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 50, S. 7-10
27. KRAUSE, W.; MATHEIS, H.; WULF, K. (1969)
Fungaemia and funguria after oral administration of *Candida albicans*.
Lancet 22, 598-599
28. KUTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (1998)
The Yeasts: a taxonomic study.
4 ed. New York, Elsevier

29. LEROY, O.; GANGNEUX, J.P.; MONTRAVERS, P.; MIRA, P.; GOUIN, F.; SOLLET, J.P.; CARLET, J.; REYNES, J.; ROSENHEIM, M.; REGNIER, B.; LORTHOLARY, O. (2009)
Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006).
Critical Care Medicine 37, S. 1612-1618
30. LODDER, J. (1971)
The Yeasts-ataxonomic study
North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London
31. MANE, A.; PANCHVALLI, S.; BEMBALKAR, S.; RISBUD, A. (2010)
Species distribution & antifungal susceptibility of oral *Candida* colonising or infecting HIV infected individuals.
The Indian Journal of Medical Research 131, S. 836-838
32. MANFREDI, M.; MCCULLOUGH, M.J.; POLONELLI, L.; CONTI, S.; AL-KARAWI, Z.M.; VESCOVI, P.; PORTER, S.R. (2006)
In vitro antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus.
Oral Microbiology and Immunology 21, S. 177-182
33. MCCULLOUGH, M.J.; SAVAGE, N.W. (2005)
Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry.
Australian Dental Journal 50, S. 6-9
34. NINANE, J.A. (1994)
Multicentre study of fluconazole versus oral polyenes in the prevention of fungal infection in children with haematological or oncological malignancies. Multicentre study group.
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 13, S. 330-337
35. NUCCI, M.; ANAISSIE, E. (2001)
Revisiting the Source of Candidemia: Skin or Gut?
Clinical Infectious Diseases 33:1959-1967

36. ODABASI, Z.; PAETZNICK, V.; GOLDSTEIN, B.P.; REX, J.H.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. (2003)
Disk diffusion-based methods for determining *Candida* parapsilosis susceptibility to anidulafungin.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47, S. 3018-3020
37. ODDS, F.C. (1988)
Candida and candidiasis. A review and bibliography.
2nd Ed. Bailliere Tindall, London
38. OZCAN, S.K.; MUTLU, B.; DÜNDAR, D.; WILLKE, A. (2010)
Comparison of broth microdilution and E-test methods for the antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. strains isolated from blood cultures.
Mikrobyoli bülteni 44, S. 263-271
39. PAPPAS, P.G.; REX, J.H.; LEE, J.; HAMILL, R.J.; LARSEN, R.A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C.A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J.E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H.W.; EDWARDS, J.E.; DISMUKES, W.E. (2003)
A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients.
Clinical Infectious Diseases 37, S. 634-643
40. PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. (2008)
Selection of a surrogate agent (fluconazole or voriconazole) for initial susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp.: results from a global antifungal surveillance program.
Journal of Clinical Microbiology 46, S. 551-559

41. PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; HOUSTON, A.; MILLS, K.; BOLMSTROM, A.; JONES, R.N. (2000)
Evaluation of the Etest method for determining voriconazole susceptibilities of 312 clinical isolates of *Candida* species by using three different agar media.
Journal of clinical Microbiology 38, S. 3715-3717
42. PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; BOYKEN, L.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J. (2003)
Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole.
Journal of Clinical Microbiology 41, S. 1875-1880
43. PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. (2004)
Evaluation of the etest method using Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species.
Journal of Clinical Microbiology 42, S. 4977-4979
44. PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. (2007)
Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem.
Clinical Microbiology Reviews 20, S. 133-163.
45. PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T.A. AND THE GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP (2010)
Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion.
Journal of Clinical Microbiology 48, S. 1366-1377

46. PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J.H.; ALEXANDER, B.D.; ANDES, D.; BROWN, S.D.; CHATURVEDI, V.; GHANNOUM, M.A.; KNAPP, C.C.; SHEEHAN, D.J.; WALSH, T.J. (2008)
Correlation of MIC with Outcome for *Candida* Species Tested against Caspofungin, Anidulafungin, and Micafungin: Analysis and Proposal for Interpretive MIC Breakpoints.
Journal of Clinical Microbiology 46, S. 2620-2629
47. REICHERT, P.A. (2003)
Oral manifestations in HIV infection: fungal and bacterial infections, Kaposi's sarcoma.
Medical Microbiology and Immunology 192, S. 165-9
48. RESENDE DE, M.A.; DE SOUSA, L.V.; DE OLIVEIRA, R.C.; KOGA-ITO, C.Y.; LYON, J.P. (2006)
Prevalence and antifungal susceptibility of yeasts obtained from the oral cavity of elderly individuals.
Mycopathologia 162, S. 39-44
49. RUHNKE, M.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.; ENGELMANN, E.; TRAUTMANN, M. (1996)
Comparative Evaluation of Three Antifungal Susceptibility Test Methods for *Candida albicans* Isolates and Correlation with Response to Fluconazole Therapy.
Journal of Clinical Microbiology 34, S. 3208-3211
50. RÜPING, M.J.; VEHRESCHILD, J.J.; CORNELLY, O.A. (2008)
Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat.
Drugs 68, S. 1941-1962
51. SAFDAR, A.; BANNISTER, T.W.; SAFDAR, Z. (2004)
The predictors of outcome in immunocompetent patients with hematogenous candidiasis.
International Journal of Infectious Diseases 8, S. 180-186

52. SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. (1994)
Candida krusei: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen.
Journal of Medical Microbiology 41, S. 295-310
53. SCHMALRECK, A. F.; KOTTMANN, I.; REISER, A.; RUFFER, U.; SCHARR, E.; VANCA, E. (1995)
An evaluation of seven methods of testing in vitro susceptibility of clinical yeast isolates to fluconazole.
Mycoses 38, S. 359-368
54. SCULLY, C.; EL-KABIR, M.; SAMARANAYAKE, L.P. (1994)
Candida and oral candidosis: a review.
Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 5, S. 125-57
55. SEWELL, D.L.; PFALLER, M.A.; BARRY, A.L. (1994)
Comparison of Broth Macrodilution, Broth Microdilution, and E Test Antifungal Susceptibility Tests for Fluconazole.
Journal of Clinical Microbiology 32, S. 2099-2102
56. SIMS, C.R.; PAETZNICK, V.L.; RODRIGUEZ, J.R.; CHEN, E.; OSTRISKI-ZEICHNER, L. (2006)
Correlation between microdilution, E-test, and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp..
Journal of Clinical Microbiology 44, S. 2105-2108
57. VOLKHEIMER, G. (1972)
Persorption.
G. Thieme Verlag, Stuttgart
58. WEBB BC, THOMAS CJ, WILLCOX MD, HARTY DW, KNOX KW (1998)
Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species.
Australian Dental Journal 43, S. 160-166
59. WENZEL, R. P. (1995)
Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality.
Clinical Infectious Diseases 20, S. 1531-1534

60. WERNER, E.; SEIBOLD, M.; ANTWEILER, E. (1993)
Susceptibility testing of *Candida* species for fluconazole: the role of buffering in the agar dilution assay.
Mycoses 36, S. 125-130
61. WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN R.A. (1998)
Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance.
Clinical Microbiology Reviews 11, S. 382-402
62. XU, J.; MITCHELL, T.G. (2003)
Geographical Differences in Human Oral Yeast Flora.
Clinical Infectious Diseases 36, S. 221–224
63. ZONIOS, D.I. ; BENNETT, J.E. (2008)
Update on azole antifungals.
Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine 29, S. 198-210

8. Danksagung

Für die Möglichkeit, in seinem Institut arbeiten zu dürfen, bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. G. Peters, dem Direktor des Instituts für medizinische Mikrobiologie der Universität Münster.

Bei Herrn Prof. Dr. med. W. Fegeler bedanke ich mich herzlich für die sehr freundliche und engagierte Betreuung und die zahlreichen guten Ratschläge während der Durchführung meiner Arbeit.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen der mykologischen Abteilung des Instituts, insbesondere Frau Kruse, danke ich für die hilfreiche Unterstützung während der experimentellen Arbeit und für die Einführung in die technischen Verfahren.

Meinem Freund, Constantin Betz, danke ich für die hilfreichen Ratschläge während der Überarbeitung meiner Arbeit.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für die umfassende Unterstützung in allen Lebenslagen während der Jahre des Studiums und der Promotion.

9. Lebenslauf