

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. Oliver Kurzai**

**Antimykotikaresistenzen bei deutschen  
*Candida auris* Isolaten**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Sebastian Manfred Ebner  
aus Deggendorf**

**Würzburg, Oktober 2022**



Referent/Referentin: Professor Dr. med. Oliver Kurzai

Korreferent/Korreferentin: Professor Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2023

Der Promovend ist Arzt

Für Kim und Felicitas, für meine Eltern Josef  
und Edeltraud, für Julia und Johannes

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Klinisches Bild einer Candidose .....	1
1.2 Verfügbare Antimykotika und Ausbildung von Resistenzen .....	2
1.3 <i>C. auris</i> als neu entdeckte <i>Candida</i> -Spezies .....	4
1.4 Einsatz von Resistenztestung bei Candidosen .....	6
1.5 Genetische Untersuchung von Resistenzen .....	7
1.6 Zielsetzung .....	8
2. Material und Methoden .....	9
2.1 Verwendete <i>Candida</i> sp.-Stämme .....	9
2.2 Kulturelle Verfahren .....	11
2.3 Resistenztestungen .....	11
2.3.1 Resistenztestung mit YO-Platten/Mikrodilutionsplatten nach CLSI .....	11
2.3.2 Resistenztestung mit Mikrodilutionsplatten nach EUCAST .....	12
2.3.3 Resistenztestung mit Epsilonometertest .....	16
2.4 Genetische Untersuchungen .....	17
2.4.1 DNA-Isolation .....	17
2.4.2 Polymerasekettenreaktion .....	18
2.4.3 Aufreinigung der DNA-Proben .....	20
2.4.4 Gelelektrophorese zum Nachweis der PCR-Produkte .....	20
2.4.5 Sanger-Sequenzierung .....	22
2.4.6 Untersuchung der Genomsequenzen .....	22
2.4.7 Phylogenetische Einordnung der Isolate .....	23
2.5 Material und Geräte .....	24
3. Ergebnisse .....	27

3.1 Probenisolation und klinische Fälle .....	27
3.2 Auswertung der Resistenztestungen.....	30
3.2.1 Auswertung der YO-Platten/Mikrodilutionsplatten nach CLSI .....	30
3.2.2 Auswertung der Mikrodilutionsplatten nach EUCAST .....	33
3.2.3 Auswertung des E-Test-Verfahrens.....	39
3.2.4 Ergebnisse der AFST bei vorbehandelten Patienten .....	43
3.3 Ergebnisse der genetischen Untersuchung.....	46
3.3.1 Untersuchung der Hot Spot Regionen im <i>C. auris</i> <i>FKS1</i> -Gen .....	46
3.3.2 Detektierte Mutationen in <i>FKS1</i> .....	50
3.3.3 Untersuchung der <i>ERG11</i> -Region.....	51
3.3.4 Detektierte Mutationen in <i>ERG11</i> .....	52
3.3.5 Verwandtschaft zu internationalen Isolaten und geographische Herkunft..	54
4. Diskussion .....	57
4.1 Vergleich mit weltweitem Patientenkollektiv .....	57
4.2 Methodik der Resistenztestverfahren im Vergleich.....	58
4.3 Resistenzverhalten deutscher <i>C. auris</i> Isolate im Vergleich zu weltweit aufgetretenen Fällen .....	61
4.4 Bewertung der genetischen Untersuchung.....	65
4.5 Beurteilung der festgestellten Mutationen in Resistenzgenen .....	66
4.6 Geographische Herkunft der in Deutschland gewonnenen Isolate .....	68
4.7 Bedeutung von <i>C. auris</i> für deutsches Infektionsgeschehen .....	68
5. Zusammenfassung.....	70
6. Literaturverzeichnis .....	72
Appendix.....	
I. Abkürzungsverzeichnis .....	

II. Abbildungsverzeichnis .....	
III. Tabellenverzeichnis .....	
IV. Danksagung .....	
V. Lebenslauf .....	

# 1. Einleitung

## 1.1 Klinisches Bild einer Candidose

Vertreter der Spezies *Candida* gehören zu den häufigsten Auslösern humaner Mykosen (Brown et al., 2012). Die Hefepilze treten meist als opportunistische Erreger auf, welche bei einem Großteil aller Erwachsenen im Gastrointestinaltrakt zu finden sind (Schulze und Sonnenborn, 2009; Hube, 2004; Nucci und Anaissie, 2001; Pappas et al., 2018). Das klinische Bild einer Candidose ist vielfältig und reicht von der oberflächlichen Besiedlung von Haut und Schleimhäuten bis zu invasiven Formen. Verbreitete mukokutane Manifestationsformen sind beispielsweise eine oropharyngeale Candidiasis, Soor-Ösophagitis oder Vulvovaginose (Feigal et al., 1991; Takahashi et al., 2015; Ilkit und Guzel, 2011). Invasive Candidosen dagegen können häufig in Form von Organabszessen, einer Candidurie/Pyelonephritis oder als Blutstrominfektion (BSI)/Candidämie auftreten (Pappas et al., 2018). Eine Candidämie ist hierbei als besonders schwere Verlaufsform einer Candidose anzusehen. So wird die durchschnittliche 30-Tage-Mortalität einer intensivpflichtigen *Candida*-BSI mit 37 % angegeben (Koehler et al., 2019). Insgesamt können *Candida*-Spezies laut Wisplinghoff et al. in etwa 9 % aller BSI nachgewiesen werden und belegen damit Platz vier der am häufigsten in Blutkulturen detektierten Keime (Wisplinghoff et al., 2004). Als Risikofaktoren zur Ausbildung einer Blutstrominfektion werden unter anderem kürzlich stattgefundene viszeralchirurgische Eingriffe, eine länger andauernde intensivmedizinische Betreuung oder der Einsatz von Breitspektrum-Antibiosen angegeben (Kullberg und Arendrup, 2015). Hierbei bildet die Spezies *Candida albicans* (*C. albicans*) den größten Anteil an Candidämie verursachenden Pilzen in zentraleuropäischen Kliniken (Falagas et al., 2010). In den letzten Jahren konnte diesbezüglich jedoch ein Wandel beobachtet werden. Neben der allgemeinen Zunahme an invasiven Candidosen wird von einer steigenden Rate an Infektionen berichtet, welche durch *non-albicans*-Spezies ausgelöst werden (Oberoi et al., 2012; Lockhart et al., 2012). Dieser Gruppe von *non-albicans*-Vertretern kann ebenfalls der in dieser Arbeit beschriebene Hefepilz *C. auris* zugeordnet werden (Satho et al., 2009).

## 1.2 Verfügbare Antimykotika und Ausbildung von Resistenzen

Zur Behandlung einer Candidose stehen Antimykotika aus vier unterschiedlichen Wirkstoffgruppen (Echinocandin-, Triazol-, Polyen-Antimykotika und Pyrimidin-Derivate) zur Verfügung. Vertreter der *albicans*- und *non-albicans*-Spezies können sich hierbei erheblich im Resistenzverhalten gegenüber einzelnen Wirkstoffen und Antimykotika-Gruppen unterscheiden (Hii et al., 2019; Pfaller et al., 2015). Aus diesem Grund ist eine rasche Identifizierung möglicher Resistenzen und eine antibiogrammgerechte Wirkstoffauswahl, insbesondere bei neu entdeckten Spezies wie *C. auris*, für den therapeutischen Erfolg entscheidend.

Die Gruppe der Echinocandine umfasst Anidulafungin, Caspofungin und Micafungin. Diese Stoffe hemmen gemäß ihres Wirkprofils das Enzym  $\beta$ -(1,3)-D-Glucan-Synthase und behindern somit den korrekten Einbau von  $\beta$ -(1,3)-D-Glucan als Strukturprotein der fungalen Zellwand (Lackner et al., 2014). Im Falle einer vorliegenden Candidämie gelten Echinocandine laut der S1-Leitlinie der deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG) und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG) als Therapeutikum der ersten Wahl. Resistenzen sind hierbei bei *Candida* Vertretern eher selten (Groll et al., 2020; Beyda et al., 2012). Die Wirkstoffe dieser Klasse überzeugen zudem durch ihre in Bezug auf Amphotericin B geringere Toxizität und einer vergleichsweise niedrigen Rate an Arzneimittelinteraktionen, welche häufig bei Triazolen auftreten können (Groll et al., 2020).

Triazole stellen eine weitere Antimykotika-Klasse dar. Diese hemmen das Protein Lanosterol-14- $\alpha$ -Demethylase. Hierbei handelt es sich um ein P-450-Enzym, welches maßgeblich an der Herstellung von Ergosterol als lebensnotwendiges Membranprotein von Pilzen beteiligt ist (Lamb et al., 1997; Kalb et al., 1987). Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe ist Fluconazol. Nach der Einführung in den 1990er Jahren gewann der Wirkstoff aufgrund seines günstigen Nebenwirkungsprofils einen hohen Stellenwert (Sheehan et al., 1999; Pfaller et al., 2004). Als besorgniserregend erscheint jedoch derzeit der bereits beschriebene Anstieg von Infektionen durch *non-albicans*-Stämme. Laut Pfaller et al. weist *C. glabrata* als häufigster Vertreter dieser Gruppe eine stetige Zunahme von Fluconazol-Resistenzen auf. Gegenwärtig mit Resistenzraten von bis zu 10,6 %. Da für Infektionen durch *non-albicans*-Spezies häufiger weniger klinische Daten



vorliegen, kann die Auswahl von passenden Therapieschemata klinisch schwierig sein (Pfaller et al., 2019; Fidel et al., 1999). Aktuell werden Azole wie beispielsweise Voriconazol oder der im Folgenden beschriebene Polyen-Wirkstoff Amphotericin B laut der S1-Leitlinie der DMykG und der PEG lediglich bei Echinocandin-Unverträglichkeiten oder -Resistenzen als Therapieform einer bestehenden Candidämie empfohlen (Groll et al., 2020).

Das Antimykotikum Amphotericin B gehört zur Gruppe der Polyene. Bei diesem Wirkstoff, welcher bereits 1955 erstbeschrieben wurde, handelt es sich um eines der am längsten eingesetzten Antimykotika (Mesa-Arango et al., 2012; Oura et al., 1955). Trotz der langjährigen Anwendung werden Resistenzen unter *Candida*-Spezies eher selten beobachtet (Ellis, 2002). Die genaue Wirkweise des Stoffes wird gegenwärtig noch diskutiert. So scheint das Antimykotikum einerseits mit Ergosterol zu interagieren und über Porenbildung zum Zelltod zu führen. Zum anderen wird auch die Ausbildung von oxidativem Stress als Ursache für die fungizide Wirkung des Stoffes gesehen (Sokol-Anderson et al., 1988; Finkelstein, 1973; Mesa-Arango et al., 2012). Unter einer Amphotericin B-Therapie kann es zu schweren Nebenwirkungen wie allergischen Reaktionen, einer neu auftretenden Hypokaliämie oder aufgrund der Nephrotoxizität des Wirkstoffes zu einer Nierenschädigung kommen (Andstrom et al., 1996; Sabra und Branch, 1990).

Als letzte Klasse steht das Pyrimidin-Derivat 5-Flucytosin zur Verfügung. Dieses hemmt die Funktion der Thymidylat-Synthase. Bedingt durch einen Thymidin-Mangel beeinträchtigt der Wirkstoff so die korrekte DNA-Synthese von Pilzen, welche über das Enzym Cytosin-Desaminase verfügen (Diasio et al., 1978; Francis und Walsh, 1992). Weiterhin wird ein Folgeprodukt von 5-Flucytosin in die RNA eingebaut und behindert somit die fungale Proteinbiosynthese (Polak und Scholer, 1975). Laut Literatur sind die Serumspiegel des Wirkstoffes aufgrund einer schmalen therapeutischen Toleranz streng zu überwachen. Zudem neigen Pilze unter einer Monotherapie mit 5-Flucytosin zur Ausbildung von Resistenzen. Aus diesem Grund sollte der Wirkstoff nur in Kombination mit anderen Antimykotika eingesetzt werden (Francis und Walsh, 1992; Viviani, 1995).

### 1.3 *C. auris* als neu entdeckte *Candida*-Spezies

Bei *C. auris* handelt es sich um einen kürzlich entdeckten Vertreter der Spezies *Candida*. Der Keim wurde 2009 aus dem externen Gehörgang einer japanischen Patientin isoliert und von Satoh et al. erstbeschrieben (Satoh et al., 2009). Innerhalb weniger Jahre konnte eine weltweite Verbreitung des Hefepilzes beobachtet werden. So folgten der Erstbeschreibung Berichte von klinischen Nachweisen in indischen, südafrikanischen, süd- und nordamerikanischen Gesundheitseinrichtungen (Chowdhary et al., 2013; Magobo et al., 2014; Calvo et al., 2016; Vallabhaneni et al., 2017). In Europa wurde der Keim erstmals 2015/2016 identifiziert (Schelenz et al., 2016). Hierbei konnten in Deutschland im Zeitraum von 2015 bis 2017 insgesamt zwölf klinische Isolate gesammelt werden. Diese wurden jedoch in Bezug auf ihre Epidemiologie und vorliegende Antimykotikaresistenzen bisher nur teilweise untersucht (Hamprecht et al., 2019). Aktuelle Angaben der Centers for Disease Control and Prevention (CDC) zufolge liegen mittlerweile Meldungen aus 47 Ländern weltweit vor (Centers for Disease Control and Prevention, 2021).

Phylogenetisch ist *C. auris* dem CTG-Clade zuzuordnen, dessen Angehörige das CUG-Codon der mRNA nicht wie üblich zu der Aminosäure Leucin, sondern stattdessen in Serin translatieren (Du et al., 2020; Munoz et al., 2018; Kawaguchi et al., 1989; Santos und Tuite, 1995; Massey et al., 2003). Nach Munoz et al. unterscheidet sich *C. auris* genetisch jedoch deutlich von anderen Vertretern des CTG-Clades wie etwa *C. albicans* (Munoz et al., 2018). Die höchste genetische Verwandtschaft zeigt sich stattdessen zu *Candida*-Spezies, welche dem Metschnikowiaceae Sub-Clade zuzuordnen sind, wie beispielsweise *C. haemulonii* oder *C. pseudohaemulonii* (Satoh et al., 2009). Klinisch gesehen ist *C. haemulonii* ein seltener Erreger und ähnlich wie *C. auris* für hohe Raten an Antimykotika-Resistenzen bekannt (Lockhart et al., 2017; de Almeida et al., 2016; Hou et al., 2016).

Initial kam es aufgrund mangelnder Vergleichsdaten in Referenzdatenbanken häufig zu Verwechslungen von *C. auris* mit nahe verwandten *Candida*-Spezies und daraus folgenden Fehlidentifikationen (Jeffery-Smith et al., 2017; Wagener und Kurzai, 2019). Nach Lee et al. gibt es Hinweise darauf, dass der Keim schon vor 2009 verbreitet war. So stammt nach aktuellem Forschungsstand das älteste retrospektiv identifizierte *C. auris*

Isolat aus dem Jahr 1996 (Lee et al., 2011). Einen umfassenden Überblick über einzelne Identifikationsverfahren und mögliche Verwechslungen mit anderen Spezies bilden hierbei die von den CDC gesammelten Informationen (Centers for Disease Control and Prevention, 2020a). Mittlerweile haben sich massenspektrometrische Methoden wie das Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)-Verfahren insbesondere in Verbindung mit einer molekularen Artbestimmung im Sinne einer Sequenzierung der Internal-Transcribed-Spacer-Regionen (ITS1/ITS2) als verlässliche Identifikationsmethoden etabliert (Kathuria et al., 2015; Wagener und Kurzai, 2019). Molekulargenetische Untersuchungen von Lockhart et al. konnten weltweit gesammelte *C. auris* Isolate bezüglich ihrer Verwandtschaft und Herkunft in vier geographische Clades einteilen. Hierbei wird zwischen einem südasiatischen (Clade I), ostasiatischen (Clade II), südafrikanischen (Clade III) und südamerikanischen (Clade IV) Typ unterschieden (Lockhart et al., 2017; Munoz et al., 2018; Chow et al., 2020). Mit einem 2018 im Iran gefundenen Isolat gibt es zudem Hinweise auf einen weiteren Clade (Clade V) (Chow et al., 2019). In einer globalen Studie konnte gezeigt werden, dass die evolutionsgeschichtliche Auftrennung der Clades ein sehr junges Ereignis ist. Dieses setzte vor etwa 400 Jahren ein. Die verschiedenen Clades zeichnen sich ebenfalls durch Unterschiede bezüglich vorhandener Antimykotikaresistenzen aus. So konnte festgestellt werden, dass Resistenzen gegen Amphotericin B vorwiegend in den Clades I und IV vertreten sind. Clade I weist zudem die höchste Zahl an Isolaten auf, welche gegen zwei oder sogar drei Antimykotika-Klassen resistent sind. Fast alle bisherigen Isolate der Clades I, III und IV wiesen Fluconazol-Resistenzen auf. Lediglich Stämme von Clade II sind gegen dieses Antimykotikum sensibel (Chow et al., 2020).

Weiterhin fällt der Keim durch eine hohe Zahl an nosokomialen Ausbrüchen auf (Wagener und Kurzai, 2019; Jeffery-Smith et al., 2017). Durch Studien konnte nachgewiesen werden, dass mit *C. auris* kolonisierte Patienten Gegenstände kontaminieren und so zur Verbreitung im klinischen Setting beitragen können (Eyre et al., 2018; Zhu et al., 2020). Dabei stellen selbst widrige Umweltbedingungen kein Hindernis für den Keim dar. So zeichnet sich der Pilz dadurch aus, mehrere Wochen auf Plastikoberflächen außerhalb eines Wirtes überlebensfähig zu bleiben (Welsh et al., 2017). Zudem weist *C. auris* auch bei hohen Temperaturen (40 °C bis 42 °C) und in einer

hypersalinen Umgebung ein Wachstum auf (Chowdhary et al., 2013; Welsh et al., 2017; Jackson et al., 2019). Besonders die für *Candida*-Spezies typischen Resistenzen gegen Desinfektionsmittel auf Basis von quartären Ammoniumverbindungen in Verbindung mit Clade-abhängig verminderten Ansprechraten auf UV-Desinfektion bei *C. auris* Isolatn stellen eine Herausforderung im klinischen Umgang mit dem Hefepilz dar (Cadnum et al., 2017; Chatterjee et al., 2020).

#### **1.4 Einsatz von Resistenztestung bei Candidosen**

Antimykotische Resistenztestungen (AFST) werden seit Jahrzehnten angewandt, um das klinische Ansprechen eines Pathogens auf eingesetzte Antimykotika vorherzusagen (Alastruey-Izquierdo et al., 2015; Rex und Pfaller, 2002). Nach der aktuellen S1-Leitlinie der DMykG und PEG wird bei allen *Candida* Isolatn, welche aus Blutkulturen oder durch sterile Vorgehensweise gewonnen wurden, eine Ermittlung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) zur Bestimmung vorliegender Antimykotikaresistenzen empfohlen (Groll et al., 2020). Eine besondere Herausforderung ist hier die Einordnung von *Candida*-Spezies ohne bereits vorliegende klinische Breakpoints (Hata et al., 2020). Bei *C. auris* handelt es sich um einen solchen Vertreter. Zur Etablierung einheitlicher Resistenztestverfahren wurden jeweils von dem US-amerikanischen Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) und dem European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Standards festgelegt (CLSI, 2017; Arendrup et al., 2017). Die Verfahren unterscheiden sich nach Pfaller et al. nur geringfügig. So wird bei beiden Methoden ein Mikrodilutionstestverfahren und ein Medium mit RPMI 1640 als Hauptbestandteil genutzt. Lediglich bei der Herstellung des Inoculum ( $0,5-2,5 \times 10^3$  CFU/mL vs.  $0,5-2,5 \times 10^5$  CFU/ml) und bei dem verwendeten Glucoseanteil (0,2 % vs. 2,0 %) des Mediums gibt der Ansatz des EUCAST jeweils eine höhere Konzentration vor (Pfaller et al., 2011). Beide Verfahren zeigten insgesamt eine hohe Übereinstimmung in den ermittelten Ergebnissen mit Ausnahme von Abweichungen bei bestimmten *Candida*-Spezies (Pfaller et al., 2010; Pfaller et al., 2014). Eine weitere Möglichkeit zur AFST stellen kommerzielle Mikrodilutionssysteme wie die Sensititre™ YeastOne™ YO10 AST Plates (YO-Platten) dar. Diese setzten meist zusätzlich Farbstoffe zur besseren Identifizierung ein (Cortés und Corrales, 2018; Sanguinetti und

Posteraro, 2018). Schließlich stehen noch Epsilometertest-Verfahren (E-Test) zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten Agar-Diffusionstest. Durch ein Konzentrationsungleichgewicht wird die Diffusion eines Wirkstoffes in ein Medium erreicht (Sanguinetti und Posteraro, 2018).

## 1.5 Genetische Untersuchung von Resistenzen

Mit dem Whole Genome Sequencing (WGS) und der Sanger-Sequenzierung stehen zwei Verfahren zur Identifikation und Darstellung von Genabschnitten zur Verfügung. Jene Methoden können genutzt werden, um Korrelationen zwischen Mutationen in Genen und auftretenden Resistenzen in AFST zu identifizieren (Garnaud et al., 2015; Alexander et al., 2013; Garcia-Effron, 2021). Für *Candida*-Spezies sind zahlreiche Regionen nachgewiesen, welche einen Einfluss auf die Ausbildung von Antimykotikaresistenzen haben (Pristov und Ghannoum, 2019; Spettel et al., 2019; Silva et al., 2020). Dem *FKSI*-Gen, welches für die katalytische Untereinheit der  $\beta$ -(1,3)-D-Glucan-Synthase kodiert, kommt hierbei laut Literatur eine bedeutende Rolle zu. Dieses Gen ist speziesübergreifend hochkonserviert und besitzt in einigen Pilzen, wie z.B. *C. glabrata* auch ein Paralog namens *FKS2*. Seit langem ist ein Zusammenhang zwischen mutationsbedingten Aminosäuresubstitutionen in sogenannten Hot Spots und der damit verbundenen Ausbildung von Echinocandin-Resistenzen bekannt (Douglas et al., 1997; Castanheira et al., 2010; Fraser et al., 2020; Aldejohann et al., 2021). Für *C. albicans* erwiesen sich der *FKSI*-Hot Spot 1 und 2 als resistenzbestimmende Regionen (Lackner et al., 2014).

Azol-Resistenzen hingegen, stehen bei *C. albicans* Wildtypen häufig mit Mutationen in der *ERG11*-Region in Verbindung (Spettel et al., 2019). Durch Lockhart et al. konnte dieser Zusammenhang ebenso bei international gesammelten *C. auris* Isolaten festgestellt werden (Lockhart et al., 2017). Ziel dieser Arbeit war es daher, die in Deutschland gewonnenen *C. auris*-Isolate erstmals auf Mutationen in der *ERG11*- und *FKSI*-Hot Spot 1/2 Region zu untersuchen und mit international gesammelten Ergebnissen zu vergleichen.

## 1.6 Zielsetzung

Bei dem Hefepilz *Candida auris* handelt es sich um einen 2009 entdeckten Vertreter der Spezies *Candida*. Seit der Erstbeschreibung fiel der Hefepilz durch eine rasche globale Verbreitung bei gleichzeitig hohen Raten an Antimykotikaresistenzen auf. In Deutschland konnten im Zeitraum von 2015 bis 2017 insgesamt zwölf *C. auris* Isolate gesammelt werden, deren epidemiologisches Auftreten und Resistenzverhalten bisher jedoch nicht vollständig untersucht wurden. Aus diesem Grund widmet sich die hier vorliegende Arbeit folgenden Zielen:

1. Beurteilung des Resistenzverhaltens deutscher Isolate durch 3 unabhängige Resistenztestverfahren (EUCAST oder CLSI-konform)
2. Analyse der Resistenz-assoziierten Gene *FKS1* und *ERG11* auf vorhandene Mutationen
3. Einordnung der deutschen Isolate und Fallberichte in das globale Geschehen und Einschätzung der Bedeutung für das deutsche Gesundheitssystem

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Verwendete *Candida* sp.-Stämme**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwölf klinische Isolate von *C. auris* untersucht, welche zwischen 2015 und 2017 in verschiedenen deutschen Krankenhäusern isoliert und anschließend an das Nationale Referenzzentrum für invasive Pilzinfektionen (NRZMyk) gesendet wurden (Tabelle 1). Als Referenzstamm für die Testung mit Mikrodilutionsplatten nach EUCAST diente der *C. krusei*-Stamm CF14 (Tabelle 1). Um die in Deutschland gesammelten Wildtypen mit einem bereits bekannten *C. auris* Vertreter zu vergleichen, wurde das Isolat DSMZ 21092 als Referenzstamm ausgewählt. Anhand dieses Stammes erfolgte die Erstbeschreibung von *C. auris* im Jahr 2009 (Tabelle 1, Satoh et al., 2009).

**Tabelle 1: Verwendete *Candida* sp.-Stämme**

<b>Name des Isolats</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Materialgewinn</b>	<b>Quelle</b>	<b>Referenz</b>
<i>C. krusei</i> CFI4	Wildtyp	Klinisches Isolat	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg	keine
<i>C. auris</i> DSMZ 21092	Wildtyp	Klinisches Isolat Ohr (Japan)	DSMZ, Braunschweig	Satoh et al., 2009
<i>C. auris</i> NRZ-2015-214	Wildtyp	Klinisches Isolat aus Blutkultur	NRZMyk, Jena	Hamprecht et al., 2019
<i>C. auris</i> NRZ-2017-288	Wildtyp	Klinisches Isolat aus Katheterurin	NRZMyk, Jena	Hamprecht et al., 2019
<i>C. auris</i> NRZ-2017-367	Wildtyp	Klinisches Isolat aus intraoperativer Gewebsprobe (Abdomen)	NRZMyk, Jena	Hamprecht et al., 2019
<i>C. auris</i> NRZ-2017-394-1	Wildtyp	Klinisches Isolat aus Katheterurin	Uniklinik Köln	Hamprecht et al., 2019
<i>C. auris</i> NRZ-2017-394-2	Wildtyp	Klinisches Isolat aus Urin, Folgeisolat von NRZ-2017-394-1	Uniklinik Köln	Hamprecht et al., 2019
<i>C. auris</i> NRZ-2017-394-3	Wildtyp	Klinisches Isolat von Leistenabstrich, Folgeisolat von NRZ-2017-394-1	Uniklinik Köln	Hamprecht et al., 2019
<i>C. auris</i> NRZ-2017-394-4	Wildtyp	Klinisches Isolat aus Nasenraum, Folgeisolat von NRZ-2017-394-1	Uniklinik Köln	Hamprecht et al., 2019
<i>C. auris</i> NRZ-2017-394-5	Wildtyp	Klinische Isolat aus Tracheostoma, Folgeisolat von NRZ-2017-394-1	Uniklinik Köln	Hamprecht et al., 2019
<i>C. auris</i> NRZ-2017-505-1	Wildtyp	Klinisches Isolat aus Blutkultur	Uniklinik Aachen	Hamprecht et al., 2019
<i>C. auris</i> NRZ-2017-505-2	Wildtyp	Klinisches Isolat aus Urin, Folgeisolat von 2017-505-1	Universitätsklinikum Bonn	Hamprecht et al., 2019
<i>C. auris</i> NRZ-2017-505-3	Wildtyp	Klinisches Isolat aus Urin, Folgeisolat von 2017-505-1	Universitätsklinikum Bonn	Hamprecht et al., 2019
<i>C. auris</i> NRZ-2017-545	Wildtyp	Klinisches Isolat aus Urin	Uniklinik Regensburg	Hamprecht et al., 2019



## **2.2 Kulturelle Verfahren**

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Isolate unter sterilen Bedingungen auf YPD-Agar-Platten (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % D-Glukose, 2 % Agar) übertragen und bei 37 °C für 48 h inkubiert. Anschließend wurden diese bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert und alle drei bis vier Wochen auf eine neue YPD-Agar-Platte überimpft. Vor jedem Experiment wurden die Isolate auf Sabouraud-Glucose-Agar-Platten (Agar 15 g/L, D(+)-Glucose 40 g/L, Pepton 10 g/L) übertragen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Von diesen Platten konnten einzelne Kolonien für die entsprechenden Versuche geerntet werden. Nach jeder Überimpfung wurden Proben der bewachsenen Sabouraud-Glucose-Agar-Platten mit einem Lichtmikroskop auf eine etwaige Kontamination mit anderen Mikroben überprüft. Das Material wurde hierbei in 40-facher Vergrößerung untersucht.

## **2.3 Resistenztestungen**

### **2.3.1 Resistenztestung mit YO-Platten/Mikrodilutionsplatten nach CLSI**

Für die Resistenztestung im Mikrodilutionsverfahren nach CLSI-Vorgaben wurden die kommerziell hergestellten Sensititre™ YeastOne™ YO10 AST Plates von Thermo Fisher Scientific Inc. verwendet. Hierbei handelt es sich um ein kolorimetrisches Verfahren. Das Belegungsschema der Platten ist in Abbildung 1 ersichtlich.

Von einer Übernachtkultur auf Sabouraud-Glucose-Agar wurden ein bis zwei kleine Kolonien mit einem zuvor autoklavierten Wattestäbchen entnommen, anschließend in 1 ml Aqua demineralisata gelöst und für 15 sec mittels Vortex gemischt. Mit einem Densimeter (Densicheck) wurde ein McFarland Standard von 0,5 eingestellt. 20 µl der eingestellten Kultur wurden in 11 ml YeastOne® inoculum broth (RPMI-Lösung mit alamarBlue™ Reagenz) gelöst und resuspendiert. Bei dem verwendeten alamarBlue™-Reagenz handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff auf Resazurinbasis. Anschließend wurden die Wells der YO-Platten (96-Well-Platten) mit je 100 µl der erhaltenen Lösung befüllt und mit einer Klebefolie verschlossen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass zwischen dem Beimpfen der YeastOne® inoculum broth-Lösung und Inkubation maximal 15 min vergingen. Die Platten wurden mit Alufolie ummantelt, bei 35 °C exakt 24 h bebrütet und anschließend mittels Spiegel (mit einem weißen Blatt als

Hintergrund) fotografiert und optisch ausgewertet. Aufgrund eingeschränkter Verfügbarkeit der YO-Platten wurde jedes Isolat einmal getestet (n=1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Pos	AND 0,015	AND 0,03	AND 0,06	AND 0,12	AND 0,25	AND 0,5	AND 1	AND 2	AND 4	AND 8	AB 0,12
B	MF 0,008	MF 0,015	MF 0,03	MF 0,06	MF 0,12	MF 0,25	MF 0,5	MF 1	MF 2	MF 4	MF 8	AB 0,25
C	CAS 0,008	CAS 0,015	CAS 0,03	CAS 0,06	CAS 0,12	CAS 0,25	CAS 0,5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	AB 0,5
D	FC 0,06	FC 0,12	FC 0,25	FC 0,5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64	AB 1
E	PZ 0,008	PZ 0,015	PZ 0,03	PZ 0,06	PZ 0,12	PZ 0,25	PZ 0,5	PZ 1	PZ 2	PZ 4	PZ 8	AB 2
F	VOR 0,008	VOR 0,015	VOR 0,03	VOR 0,06	VOR 0,12	VOR 0,25	VOR 0,5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	AB 4
G	IZ 0,015	IZ 0,03	IZ 0,06	IZ 0,12	IZ 0,25	IZ 0,5	IZ 1	IZ 2	IZ 4	IZ 8	IZ 16	AB 8
H	FZ 0,12	FZ 0,25	FZ 0,5	FZ 1	FZ 2	FZ 4	FZ 8	FZ 16	FZ 32	FZ 64	FZ 128	FZ 264

**Abbildung 1: Belegungsschema YO-Platten**

Modifiziert nach Sensititre™ YeastOne™ YO10 ASTPlates (Thermo Fischer Scientific Inc., 2016)

Abkürzungen: AND: Anidulafungin, MF: Micafungin, CAS: Caspofungin, FC: 5-Flucytosin, PZ:

Posaconazol, VOR: Voriconazol, IZ: Itraconazol, FZ: Fluconazol, AB: Amphotericin B, Pos:

Positivkontrolle. Die angezeigten Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Konzentration in µg/ml.

### 2.3.2 Resistenztestung mit Mikrodilutionsplatten nach EUCAST

Zunächst wurde ein RPMI 2 % G Medium nach den Vorgaben des EUCAST erstellt (Tabelle 2). Hierfür wurden die erforderlichen Mengen D(+)-Glucose, MOPS und RPMI 1640 abgewogen und in Aqua destillata (steriles Wasser) gelöst. Mithilfe einer 1 M NaOH-Lösung wurde unter ständigem Rühren durch einen Magnetrührer ein pH-Wert von pH 7,0 bei Raumtemperatur eingestellt. Anschließend wurde das Volumen mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und durch einen Spritzenfilter (50er Greiner-Spritzensystem und Filter mit Porendurchmesser 0,22 µm) sterilfiltriert. Die Lösung wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Vor jedem Versuch wurde das Medium zunächst lichtmikroskopisch (40-fache Vergrößerung) auf mögliche Kontaminationen untersucht und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt.

**Tabelle 2: Rezept RPMI 2 % G Medium**

	<b>2xkonzentriert (für 100ml Ansatz)</b>
RPMI 1640 (in g)	2,08
MOPS (in g)	6,91
D(+)-Glucose (in g)	3,6
Wasser (in ml)	90

Modifiziert nach EUCAST (Arendrup et al., 2017)

Die Erstellung der Mikrodilutionsplatten folgte ebenfalls einem durch das EUCAST etablierten Verfahren, welches im weiteren Verlauf modifiziert wurde (Arendrup et al., 2017). Als Testplatten wurden sterile 96-Well-Platten verwendet. Diese wurden nach dem in Abbildung 2 dargestellten Schema belegt. So konnten gleichzeitig sechs der gesammelten *C. auris* Isolate bei zwölf unterschiedlichen Antimykotika-Konzentrationen (0 bis 64 µg) getestet werden. Jede Platte wurde zusätzlich mit 2 Referenzstämmen, dem *C. auris* Isolat DSMZ 21092 und dem *C. krusei* Isolat CFI4 bebrütet. Die in den Versuchen abgelesenen MHK-Werte für das *C. krusei* CFI4 Isolat wurden mit den von dem EUCAST vorgegebenen Werten zur Qualitätskontrolle (QC Tables for antifungal susceptibility testing) verglichen (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020). Lagen die ermittelten Werte für das Isolat im Referenzbereich und war zudem eine bewachsene Positivkontrolle vorhanden, wurde der Resistenztest als erfolgreich bewertet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
*	0	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
A	CK	CK	CK	CK	CK	CK	CK	CK	CK	CK	CK	CK
B	DS	DS	DS	DS	DS	DS	DS	DS	DS	DS	DS	DS
C	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1
D	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2
E	CA3	CA3	CA3	CA3	CA3	CA3	CA3	CA3	CA3	CA3	CA3	CA3
F	CA4	CA4	CA4	CA4	CA4	CA4	CA4	CA4	CA4	CA4	CA4	CA4
G	CA5	CA5	CA5	CA5	CA5	CA5	CA5	CA5	CA5	CA5	CA5	CA5
H	CA6	CA6	CA6	CA6	CA6	CA6	CA6	CA6	CA6	CA6	CA6	CA6

**Abbildung 2: Belegungsschema Mikrodilutionsplatten nach EUCAST**

CA = *C. auris* Isolat, 6 Isolate pro Platte (Nummerierung von 1 bis 6)

DS = *C. auris* Isolat DSMZ 21092 als Referenzstamm

CK = *C. krusei* CFI4 als Referenzstamm

\* Die angezeigten Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Konzentration in µg/ml.

Die Mikrodilutionstestung wurde mit den Echinocandinen Caspofungin und Anidulafungin durchgeführt. Als Antimykotikum-Stock diente hierbei jeweils eine Ausgangslösung (gelöst in DMSO) mit einer Konzentration von 1 mg/ml. Für besonders kleine Konzentrationen (siehe Tabelle 3, ab einer Endkonzentration von 1 µg/ml) wurde der Antimykotikum-Stock zunächst mit DMSO im Verhältnis 1:100 verdünnt (10 µl Antimykotikum-Stock auf 990 µl DMSO), sodass eine Antimykotikum-Konzentration (c) von 10 µg/ml erreicht wurde. Mit RPMI 2 % G Medium als Lösungsmittel wurde der Stock auf die gewünschte Konzentration (einzustellende Konzentration 2x) verdünnt. Diese entsprach der doppelten Konzentration der Endkonzentration, um eine Verdünnung durch das spätere Einbringen der mit den Isolaten versetzten RPMI-Suspension (Verhältnis 1:1) zu berücksichtigen (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Konzentrationseinstellung Mikrodilutionsplatten nach EUCAST**

Endkonzentration in Well (in $\mu\text{l/ml}$ )	Einzustellende Konzentration 2x (in $\mu\text{l/ml}$ )	Antimykotikum/RPMI-Verhältnis (in $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ )
64	128	128/872
32	64	64/936
16	32	32/968
8	16	16/984
4	8	8/992
2	4	4/996
1	2	*200/800
0,5	1	*100/900
0,25	0,5	*50/950
0,125	0,25	*25/975
0,0625	0,125	*12,5/988
0	0	*0/1000
		*zuvor Stock-Verdünnung Antimykotikum/DMSO  1 : 100 c: 1mg/ml $\rightarrow$ 10 $\mu\text{l/ml}$

Anschließend wurden 2 bis 3 Kolonien von einer Übernachtskultur auf Sabouraud-Glukose-Agar in 5 ml sterilem Wasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend 1:100 mit sterilem Wasser verdünnt. Daraufhin wurde die Konzentration mit einer Neubauer Zählkammer und Mikroskop bestimmt. Dabei wurde eine Konzentration von  $1-5 \times 10^6$  CFU/ml als Zielwert festgelegt. Die gelösten Kulturen wurden mit sterilem Wasser verdünnt, bis die erwünschte Konzentration bei einem angestrebten Endvolumen von 1 ml erreicht wurde. Für die Testung des Wirkstoffes Anidulafungin wurde das Verfahren um die Zugabe von Resazurin erweitert. 150  $\mu\text{l}$  der zuvor eingestellten Suspension (gelöst in sterilem Wasser) wurden zusammen mit 30  $\mu\text{l}$  des Resazurinstock in 1320  $\mu\text{l}$  sterilem Wasser gelöst und mittels Vortex gemischt. Resazurin als Farbindikator der Zellvitalität ist kein Bestandteil des von EUCAST etablierten Verfahrens (Arendrup et al., 2017). Anschließend wurden in jedes Well 100  $\mu\text{l}$  der erstellten Isolat-Resazurin-Suspension und im Anschluss ein gleiches Volumen der Antimykotikum-RPMI-Lösung eingebracht. Hierbei wurde darauf geachtet, die Platten innerhalb von 10 min bei abgedunkeltem

Raum zu befüllen, da Resazurin in diesem Versuch sehr lichtempfindlich reagierte. Die Platten wurden in Alufolie gewickelt und bei 37 °C für mindestens 48 h bebrütet. Das von dem EUCAST etablierte Verfahren sieht eine photometrische Auswertung der inkubierten Platten vor (Arendrup et al., 2017). Da für die vorliegende Arbeit kein Mikroplatten-Reader zur Verfügung stand, konnten die Proben nur visuell via Spiegel beurteilt werden. Insgesamt wurde jedes zum Zeitpunkt verfügbare Isolat (zehn der zwölf untersuchten Isolate) dreimal getestet (n=3).

### **2.3.3 Resistenztestung mit Epsilometertest**

Neben den oben beschriebenen Vorgehensweisen wurde auch das Epsilometertest-Verfahren zur Resistenztestung genutzt (bioMérieux, 2013). Von einer Übernachtskultur auf Sabouraud-Glukose-Agar wurden 2 bis 3 kleine Kolonien mit einer Pipettenspitze entnommen und in 5 ml sterilem Wasser aufgelöst und resuspendiert. Anschließend wurde die Konzentration der gelösten Kulturen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und eines Lichtmikroskops bestimmt. Die erwünschte Konzentration betrug 1,5 bis 5,0 x 10<sup>6</sup> CFU/ml. Die gelösten Kulturen wurden mit sterilem Wasser verdünnt, bis die erwünschte Konzentration erreicht wurde. 200 µl der eingestellten Lösung wurden anschließend auf eine RPMI-Agarplatte (RPMI 1640, 2 % Glucose, MOPS) übertragen und mit einer sterilen Plastikwalze gleichmäßig ausplattiert. Weiter im Verlauf wurden die E-Teststreifen auf Raumtemperatur erwärmt. Währenddessen wurden die beimpften RPMI-Platten unter einer Sterilwerkbank leicht getrocknet. Pro Platte wurde ein Teststreifen mit einer sterilen Pinzette zentral platziert. Die Platten wurden 24 h bis 48 h bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert und anschließend abgelesen und fotografiert. Das Experiment wurde mit je einem Vertreter der drei Antimykotika-Klassen durchgeführt. So wurden Teststreifen mit Voriconazol (Konzentration von 0,002 bis 32 µg/ml) als Triazol-, Amphotericin B (Konzentration von 0,002 bis 32 µg/ml) als Polyen- und Caspofungin (Konzentration von 0,002 bis 32 µg/ml) als Echinocandin-Vertreter verwendet. Der Versuch folgte einem dem CLSI M27-A2 Standard vergleichbarem Verfahren (bioMérieux, 2013).

## 2.4 Genetische Untersuchungen

### 2.4.1 DNA-Isolation

Die DNA-Präparation erfolgte dem im Folgenden erläuterten Schema. Zunächst wurde ein Lysispuffer nach der in Tabelle 4 dargestellten Zusammensetzung hergestellt. Außerdem wurde Ethanol (Ausgangslösung mit 99,8 %) mit Wasser auf die gewünschte Endkonzentration (Ethanol 70 %) verdünnt (Tabelle 5).

**Tabelle 4: Herstellung Lysispuffer**

Reagenzien	Endkonzentration
5 ml von Tris (1 M, pH 7,0)	50 mM Tris (pH 7,0)
15 ml von SDS (20 %)	3 % SDS
10 ml von EDTA (0,5 M, pH 8,0)	50 mM EDTA (pH 8,0)
70 ml von A. bidest.	-

Ansatz für 100 ml

**Tabelle 5: Herstellung Ethanol 70 %**

Reagenzien	Benötigtes Volumen (in ml)
Ethanol, $\geq 99,8$ %	700
steriles Wasser	300

Ansatz für 1 l

Im Anschluss wurde das Pilzmaterial auf Sabouraud-Glukose-Agarplatten in einem Brutschrank für 48 h bei 35 °C inkubiert. Ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde mit 400 µl sterilen Glasperlen und 1 ml Lysispuffer (Tabelle 4) befüllt. Unter einer Sterilwerkbank wurden 3 bis 5 Hefekolonien mit einer Pipettenspitze in das Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und resuspendiert. Das Pilzmaterial wurde 5 min mittels Vortex geschreddert und unter Schüttelinkubation für 1 h bei 68 °C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 16000xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt. Ein dem Überstand entsprechendes Volumen an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (pH 7,0) wurde hinzugegeben und nach mehrfachem Umkehren für 10 min bei 16000xg zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abpipettiert, mit einem identischen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (pH 7,0) versetzt und für 10 min bei 16000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-

Reaktionsgefäß übertragen und mit Ethanol ( $\geq 99,8\%$ ) auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml aufgefüllt und gemischt. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit einer Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Ethanol 70 % (Tabelle 5) gewaschen. Die Lösung wurde für 5 min bei 16000xg zentrifugiert. Des Weiteren wurde Ethanol vorsichtig abpipettiert, sodass lediglich das DNA-Pellet in dem Eppendorf-Reaktionsgefäß verblieb. Dieses wurde bei 35 °C vollständig getrocknet und darauffolgend in 50  $\mu\text{l}$  DNase-freiem Wasser gelöst und resuspendiert. Außerdem wurden 3  $\mu\text{l}$  Ribonuklease A hinzugefügt.

Die Konzentration der erhaltenen DNA-Lösungen wurde mit Hilfe eines Mikrovolumen-UV-VIS-Spektralphotometer (Nanodrop One C) gemessen. 1  $\mu\text{l}$  der DNA-Proben konnten unverdünnt auf die entsprechende Messeinheit aufgetragen werden. Als Leerwert diente DNase-freies Wasser, welches auch das Lösungsmittel der DNA-Proben bildete. Hierbei wurde neben der DNA-Konzentration in ng/ $\mu\text{l}$  auch der Extinktionsquotient (OD260/280) ermittelt. Ein Richtwert für eine reine DNA-Präparation ohne Kontamination sollte hierbei bei ungefähr 1,8 bis maximal 2,0 liegen. Bei Werten  $>2,0$  muss eine Kontamination durch RNA angenommen werden. Nach erfolgter Konzentrationsbestimmung wurden die Proben bei -20 °C in einem Tiefkühlschrank gelagert.

#### **2.4.2 Polymerasekettenreaktion**

Mit der *FKSI* Hot Spot 1-, *FKSI* Hot Spot 2- und *ERG11*-Region wurden insgesamt 3 Genabschnitte untersucht. Zur Vervielfältigung der jeweiligen Abschnitte wurden zunächst PCR-Ansätze erstellt (Tabelle 6) und anschließend zur Amplifizierung in einen Thermocycler überführt. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 7 dargestellt. Die entsprechenden Thermocycler-Programme sind in Tabelle 8 ersichtlich.



**Tabelle 6: PCR-Ansatz**

Reagenz	Volumen (in µl)
DNase-freies Wasser	22
NEBNext <sup>®</sup> High-Fidelity 2X PCR Master Mix	25
Primer For	1
Primer Rev	1

**Tabelle 7: Primerliste**

Primer	Sequenzen in 5'-3' Richtung	Genregion	Quelle
<i>CauFKS 1-11 fwd</i>	CTTGTCCACCATGACGATGAGATG	<i>FKSI</i> - Hot Spot 1	NRZMyk
<i>CauFKS 1-11 rev</i>	CGTAGTTCATGAAGCCAGAAACAGTAC	<i>FKSI</i> - Hot Spot 1	NRZMyk
<i>CauFKS 1-12 fwd</i>	AGACCGCTGCCTATGAGAATG	<i>FKSI</i> - Hot Spot 2	NRZMyk
<i>CauFKS 1-12 rev</i>	TCAAGTGCAAACCTTCTGTGCCT	<i>FKSI</i> - Hot Spot 2	NRZMyk
<i>G1-CauERG 11</i>	CACCAACAGAATGAACCTCGACAT	<i>ERG11</i>	NRZMyk
<i>G4-CauERG 11</i>	TAGGCTGGAGCTGGTTTGGTGAAGA	<i>ERG11</i>	NRZMyk

Mit Primerpaaren aus forward (for)- und reverse (rev)- Primern für jede untersuchte Genregion

**Tabelle 8: PCR-Programm**

Primer	<i>FKSI</i> Hot Spot 1	<i>FKSI</i> Hot Spot 2	<i>ERG11</i>
Initiale Denaturierung	4 min bei 94 °C	4 min bei 94 °C	4 min bei 95 °C
Denaturierung*	1 min bei 94 °C	1 min bei 94 °C	1 min bei 95 °C
Annealing*	1 min bei 55 °C	1 min bei 55 °C	1 min bei 55 °C
Elongation*	2 min bei 72 °C	2 min bei 72 °C	4 min bei 72 °C
*Anzahl Zyklen	40	40	40
Inkubation	10 min bei 72 °C	10 min bei 72 °C	10 min bei 72 °C
Lagern bei	16 °C	16 °C	16 °C

Die mit \* gekennzeichneten Phasen wurden zyklisch wiederholt

### **2.4.3 Aufreinigung der DNA-Proben**

Die Aufreinigung erfolgte mit einem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit unter Anwendung von Reinigungssäulen mit Silica-Membran- Technologie. Das Kit wurde mit den im Folgenden verwendeten Reagenzien geliefert. Zunächst wurde zu den gewonnenen DNA-Proben ein 2x Volumen NTI gegeben. Die erhaltene Lösung wurde auf eine Silica-Membran Reinigungssäule, welche auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt war, geladen. Nun wurde für 30 sec bei 11000xg zentrifugiert und der in Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelte Durchfluss verworfen. Im nächsten Schritt wurden 700 µl NT3 auf die Reinigungssäule geladen und für 30 sec bei 11000xg zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Die Reinigungssäule wurde für 1 min bei 11000xg getrocknet. Im Anschluss wurde die Reinigungssäule auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und mit 25 µl Elution-Buffer beladen. Nach einer Inkubation von 1 min bei Raumtemperatur wurde die beladene Säule für 1 min bei 11000xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde gesammelt und zur Langzeitaufbewahrung bei -20 °C aufbewahrt.

### **2.4.4 Gelelektrophorese zum Nachweis der PCR-Produkte**

Des Weiteren wurde ein TAE 1x Puffer hergestellt (Tabelle 9). Um die durch die PCR erhaltenen Produkte bezüglich ihres Molekulargewichtes zu untersuchen, wurde ein 1-prozentiges Agarosegel nach dem in Tabelle 10 beschriebenen Schema erstellt. Je nach Anzahl der untersuchten Proben wurde eine Gelgröße von 12,4 cm x 14,5 cm oder 23,9 cm x 20,0 cm ausgewählt. Die pulverförmige Agarose wurde in TAE 1x Puffer gelöst und in einer Mikrowelle erwärmt. Nach kurzem Abkühlen wurde der Gelfarbstoff Midori Green Advance hinzugefügt und das Gel in eine Gelschale (Biometra Compact M Cycler oder Biometra Compact L Cycler) gegossen. Im Anschluss wurden 1 µl eines Beschwerungspuffers (GEBS) und 10 µl der DNA-Proben pro Slot eingebracht. Es wurde eine konstante Spannung von 100-125 V für 2 bis 3 h angelegt. Die Auswertung des Gels und Fotodokumentation erfolgte durch das UVP Gelstudio Plus. Zum Ablesen der Banden wurde eine DNA-Leiter mit 10 kb benutzt (Abbildung 3).

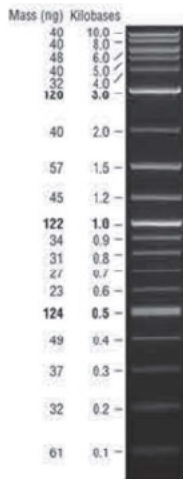
**Tabelle 9: Herstellung von TAE 1x Puffer**

Verwendete Stoffe	Volumen
TAE 50x	20 ml
Steriles Wasser	980 ml

Ansatz für 1 l, Hergestellt aus TAE 50x Ausgangslösung verdünnt mit sterilem Wasser

**Tabelle 10: Herstellung Agarosegel 1 %**

	Biometra Compact M Cycler	Biometra Compact L Cycler
Gelgröße (in cm)	12,4 x 14,5	23,9 x 20,0
1x TAE (in ml)	100	240
Agarose (in g)	1	2,4
Midori Green advance DNA stain (in µl)	5	12



**Abbildung 3: 2-Log DNA-Leiter**

Abbildung von New England Biolabs Inc. (NEW ENGLAND BIOLABS® INC, 2014). In dieser Arbeit wurde die Quick-Load® Purple 2-log DNA Ladder mit 10 kb verwendet. Visualisiert auf einem 1.0 % TBE Agarosegel.

### 2.4.5 Sanger-Sequenzierung

Die DNA-Konzentration der aufgereinigten Proben wurde via Mikrovolumen-UV-VIS-Spektralphotometer (Nanodrop One C) zweimal gemessen und hieraus ein Mittelwert gebildet. Ausgehend von den ermittelten Mittelwerten wurden die DNA-Proben auf eine Konzentration von 10 ng/μl bei einem Volumen von 10 μl verdünnt. Anschließend wurde der in Tabelle 11 beschriebene Ansatz erstellt und an LGC Genomics (Berlin) zur Sanger-Sequenzierung versandt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden im Folgenden analysiert.

Tabelle 11: Ansatz Sanger-Sequenzierung

Volumen	
10 μl	Verdünnte DNA (Endkonzentration: 10 ng/μl)
2 μl	Primer
2 μl	Wasser (DNase-frei)
+14 μl	Gesamtvolumen

### 2.4.6 Untersuchung der Genomsequenzen

Die weitere Analyse und Auswertung erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Dr. Michaela Herz (Institut für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg). Die durch die Sanger-Sequenzierung erhaltenen Basenabfolgen wurden im Anschluss mit dem Programm BLAST® ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) auf Alignments untersucht. Hierfür wurden die Sequenzen gegen das Genom des *C. auris* Referenzstammes B8441\_V2 gemappt und auf Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zum Referenzgenom untersucht. Mithilfe des Computerprogrammes Integrative Genomics Viewer (IGV) wurden die Sequenzen visualisiert. Punktmutationen, welche zu entsprechenden Aminosäureänderungen führten, wurden dokumentiert und nach der Position im Protein des untersuchten Genomabschnittes nummeriert.

#### 2.4.7 Phylogenetische Einordnung der Isolate

Die aufgereinigten DNA-Sequenzen wurden zudem an LGC Genomics Biosearch Tm Technologies zum Whole Genome Sequenzen (WGS) verschickt. Ziel des Verfahrens war die vollständige Genomsequenzierung der einzelnen Isolate. Im Rahmen eines anderen Projekts wurden die durch das WGS gewonnen Daten mit dem Genom unterschiedlicher *C. auris*-Referenzstämmen durch Dr. Amelia Barber (Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie Hans-Knöll-Institut, Forschungsgruppe: Fungal Septomics) und Dr. Dr. Michaela Herz (Institut für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg, Forschungsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. Oliver Kurzai) verglichen, auf Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) untersucht und anschließend bezüglich ihrer phylogenetischen Distanz zu Referenzstämmen geordnet. Hierbei dienten die Stämme B8441 (Pakistan) und 6684 (Indien) als Vertreter des Clade I. Der Referenzstamm B11220 gehört dem Clade II, B11221 dem Clade III und B11243 dem Clade IV an (Tabelle 12). Die Genomsequenzen wurden allesamt von NCBI (The National Center for Biotechnology Information) heruntergeladen ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genomes/?taxon=498019&utm\\_source=gquery&utm\\_medium=referral](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genomes/?taxon=498019&utm_source=gquery&utm_medium=referral)).

**Tabelle 12: Quelle der Genomsequenzen und phylogenetische Herkunft der *C. auris* Referenzstämme**

<i>C. auris</i> Stamm	Herkunftsland	Clade	Assembly Name (NCBI)	Quelle
B8441	Pakistan	I	Cand_auris_B8441_V2	CDC
6684	Indien	I	ASM118947v1	Indian Institute of Science
B11220	Japan	II	ASM301371v2	CDC
B11221	Südafrika	III	Cand_auris_B11221_V1	CDC
B11243	Venezuela	IV	Cand_auris_B11243	CDC

## 2.5 Material und Geräte

Tabelle 13: Materialliste

Produkt	Hersteller
96-Well-Platten	Sarstedt AG & Co. KG
Agarose Standard ROTI®Garose for DNA/RNA electrophoresis	Carl Roth GmbH + Co. KG
Alufolie	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
Anidulafungin Stock (1mg/ml) (gelöst in DMSO)	NRZMyk, Jena
Aqua bidest.	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
Aqua demineralisata	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
Aqua destillata (steriles Wasser)	B. Braun SE
Autoklavierte Wattestäbchen	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
Casporfungin-Stock (1mg/ml) (gelöst in DMSO)	NRZMyk, Jena
D(+)-Glucose, 250 g CELLPURE®	Carl Roth GmbH + Co. KG
DNase freies Wasser	Gibco Medien
DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG
EDTA (0,5 M, pH8,0)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,5 und 2 ml	Eppendorf SE
E-Teststreifen Amphotericin B	BioMerieu S.A.
E-Teststreifen Casporfungin	BioMerieu S.A.
E-Teststreifen Voriconazol	BioMerieu S.A.
Ethanol, ≥99,8 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
GEBS	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
Glasbeads, säuregereinigt, 425-600 µm (30-40 U.S. sieve)	Sigma-Aldrich Inc.
Klebefolie 96-Well-Platten	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
Midori Green Advance DNA Stain	Biozym Scientific GmbH
MOPS, 1 kg PUFFERAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG
NAOH 1 M	Carl Roth GmbH + Co. KG
NEBNext® High-Fidelity 2X PCR Master Mix	New England Biolabs Inc.
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Qiagen N.V.
PCR-Reaktionsgefäß	SARSTEDT AG & Co. KG
Plastikwalze	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
Porenfilter 0,22 µm (Spritzenfilter)	Carl Roth GmbH + Co. KG

Quick-Load® Purple 2-log DNA Ladder, 10 kb	New England Biolabs, Inc.
Resazurin-Stock	Sigma-Aldrich Inc.
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (pH7,0)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ribonuklease A	New England Biolabs Inc.
RPMI 1640 Medium (mit L-glutamin, ohne Phenolrot und Natriumbikarbonat)	Sigma-Aldrich Inc.
RPMI-Agarplatte (RPMI 1640, 2 %Glucose, MOPS)	Sigma-Aldrich Inc.
Sabouraud-Glukose-Agar-Platten (Agar 15 g/L, D (+)-Glucose 40 g/L, Pepton 10 g/L)	Becton Dickinson GmbH
SDS (20 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Sensititre™ YeastOne™ YO10 AST Plates	Thermo Fischer Scientific Inc., Deutschland
Spritzensystem (50er Greiner)	Sarstedt AG & Co. KG
TAE ROTIPHORESE®50x TAE Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tris (1M, pH7,0)	Carl Roth GmbH + Co. KG
YeastOne® inoculum broth	Thermo Fischer Scientific Inc., Deutschland
YPD-Agar-Platten (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % D-Glukose, 2 % Agar)	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg

**Tabelle 14: Geräteliste und verwendete Programme**

Geräte und Programme	Hersteller
Biometra Compact family Elektrophorese	Analytik Jena GmbH
Biometra Compact L Cyclor	Analytik Jena GmbH
Biometra Compact M Cyclor	Analytik Jena GmbH
Biometra Standard Power Bank P25 T	Analytik Jena GmbH
Biometra Trio Thermal Cyclor	Analytik Jena GmbH
Densimeter (Densicheck)	BioMerieux S.A.
Eppendorf ThermoMixer® Comfort (Schütterinkubator)	Eppendorf SE
INCU-Line® Brutschrank VWR	VWR LLC
Kamera (Huawei P30 Lite 48 MP)	Huawei Ltd.
Pipettensystem	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
Sterile Pinzette	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
Kühlschrank	Liebherr International-S.A.
Tiefkühlschrank (-20 °C)	Liebherr International-S.A.
Magnetrührer	BioCote Ltd.
IGV (Version 2.8.2; 23.03.2020)	Broad Institute and the Regents of the University of California
-80er Freezer	Thermo Fisher Scientific Inc., Deutschland
Mikroskop (mit Vergrößerungsstufen)	VWR LLC
Nanodrop One C (Mikrovolumen-UV-VIS-Spektralphotometer)	Thermo Fisher Scientific Inc., Deutschland
Neubauer-Zählkammer (improved)	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH
Spiegel	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
Sterilwerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc., Deutschland
UVP Gelstudio Plus	Analytik Jena GmbH
Vortex Genie 2T	Scientific Industries Inc.
Eppendorf Zentrifuge 5424	Eppendorf SE



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Probenisolation und klinische Fälle

Im Folgenden soll auf die Umstände der Probenisolation und das Patientenkollektiv näher eingegangen werden. Die aufgeführten Patientendaten wurden den an das NRZMyk übermittelten klinischen Daten entnommen (Hamprecht et al., 2019).

Insgesamt wurden in dem untersuchten Zeitraum sieben Fälle mit *C. auris* Infektionen gemeldet. Die Isolate von sechs Patienten standen zur Verfügung und konnten bezüglich ihres Resistenzverhaltens und Mutationen in Resistenzgenen untersucht werden. Bei einem Patienten (Patient Nr. 2) konnten lediglich die übermittelten Patientendaten, nicht jedoch das Isolat zur weiteren Untersuchung genutzt werden (Tabelle 15). Bei den vier Isolaten NRZ-2017-394-2, NRZ-2017-394-3, NRZ-2017-394-4 und NRZ-2017-394-5 handelt es sich um Folgeisolate von NRZ-2017-394-1. Diese wurden zu verschiedenen Zeitpunkten von Patient Nr. 3 gewonnen. Ebenso stellen NRZ-2017-505-2 und NRZ-2017-505-3 Folgeisolate von NRZ-2017-505-1 dar. Diese wurden aus unterschiedlichem Probenmaterial von Patient Nr. 6 isoliert (Tabelle 1, Tabelle 15). Bei allen anderen untersuchten Proben handelt es sich um Einzelisolate.

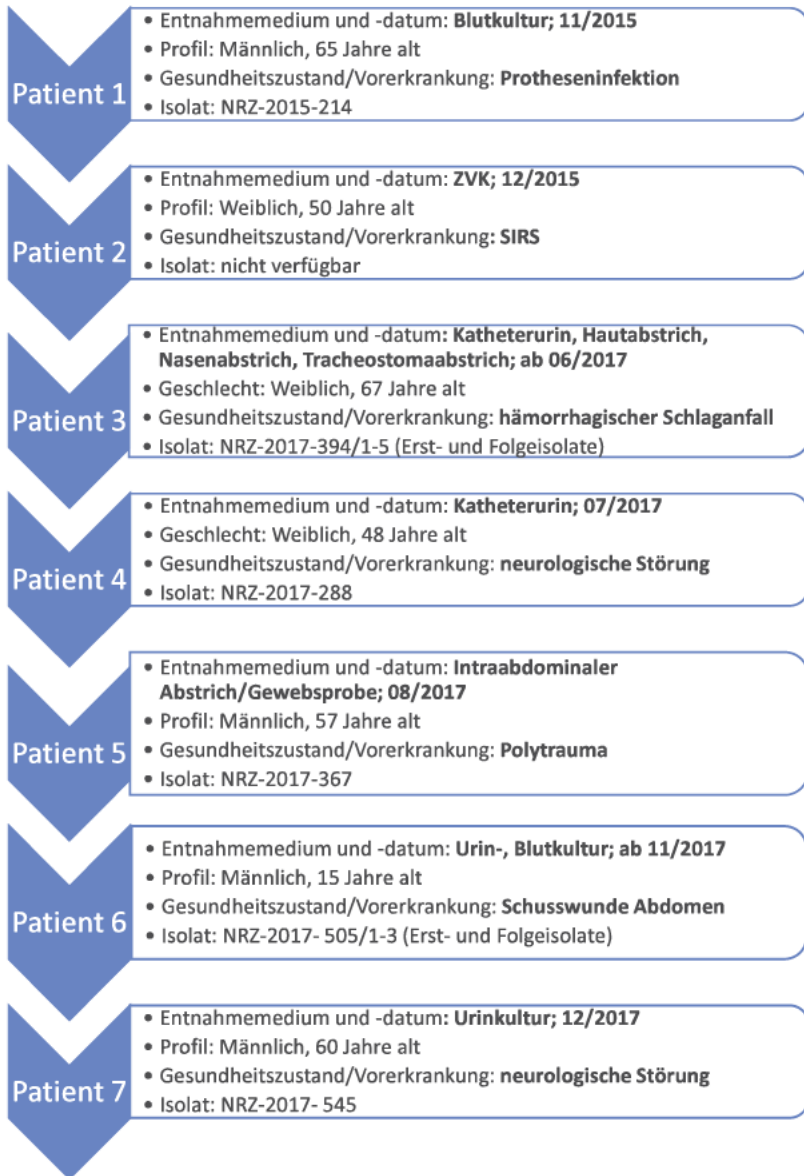
Von den sieben untersuchten *C. auris* Fällen hielten sich sechs Personen zuvor im Ausland auf und wurden dort in Gesundheitseinrichtungen medizinisch versorgt (85,7 %). Anschließend erfolgte eine Weiterbehandlung in deutschen Kliniken, in welchen der Keim schließlich isoliert wurde (Tabelle 1). Mit Abstand am häufigsten reisten die Betroffenen aus Ländern des Nahen beziehungsweise Mittleren Ostens ein (66,7 %). Insgesamt wurden drei Patienten mit Antimykotika therapiert, wobei es bei zwei Patienten zu einer Besserung der Klinik kam oder eine *C. auris* Infektion nicht mehr nachweisbar war (Tabelle 15). Hervorzuheben ist hierbei das von Patient 6 gewonnene Isolat NRZ-2017-505-1 und dessen Folgeisolate. Auch nach 6-monatiger antimykotischer Therapie mit liposomalem Amphotericin B und Voriconazol konnte bei diesem Patienten eine *C. auris* Besiedlung nachgewiesen werden (Tabelle 15). Da bei allen anderen Fällen die klinischen Zeichen einer Candidose fehlten, wurde auf eine antimykotische Behandlung verzichtet (Hamprecht et al., 2019).

**Tabelle 15: Auslandsaufenthalte der Patienten und eingesetzte Therapeutika**

Patienten Nr.	Bezeichnung Isolat	Behandlung im Ausland vor Probenisolation	Behandlung mit Antimykotikum	Status nach Behandlung
1	NRZ-2015-214	Oman	Echinocandin	<i>C. auris</i> nicht nachweisbar
2	Kein Isolat verfügbar	Keine	Nein	-
3	NRZ-2017-394/1-5	Saudi-Arabien	Nein	-
4	NRZ-2017-288	Dubai	Nein	-
5	NRZ-2017-367	Russland	Amphotericin B	Besserung des Patientenzustandes
6	NRZ-2017-505/1-3	Afghanistan	Liposomales Amphotericin B und Voriconazol	Weiterhin bestehende Candidurie
7	NRZ-2017-545	UK, USA, Kenia	Nein	-

Modifiziert nach Hamprecht et al. (Hamprecht et al., 2019)

Betrachtet man das Profil der Patienten, waren knapp mehr Männer (57,1 %) betroffen. Patient 6 stellte mit 15 Jahren das jüngste Individuum dar. Alle anderen Patienten waren mindestens 48 Jahre alt (Abbildung 4). Insgesamt betrachtet lag das Alter im Durchschnitt bei circa 52 Jahren. Alle Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Probenisolation eine vorausgehende Erkrankung auf. Hierbei handelte es sich am häufigsten um neurologische Grunderkrankungen (42,9 %), kürzlich erlittene Traumata (28,6 %) oder inflammatorische Geschehen unterschiedlicher Genese (Abbildung 4). Nach Hamprecht et al. wurden bei vier Erkrankten in kurzem zeitlichem Abstand zum erstmaligen Keimnachweis Operationen (57,1 %) oder andere invasive Maßnahmen wie die Anlage eines zentralen Venenkatheters (ZVK) in einem Fall (14,3 %) durchgeführt. Nach den hier vorliegenden Informationen (Stand 2019) ist keine der sieben untersuchten Personen an einer *C. auris* Infektion verstorben (Hamprecht et al., 2019).



**Abbildung 4: Patientendaten und Chronologie des Probengewinns**  
 Erstellt nach Daten von Hamprecht et al. (Hamprecht et al., 2019)

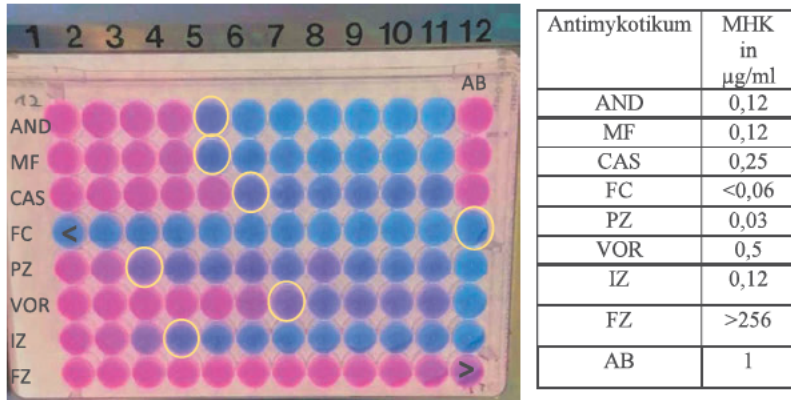
Insgesamt betrachtet lag bei vier Patienten eine Infektion durch *C. auris*, bei drei lediglich eine Kolonisierung vor (Wagener und Kurzai, 2019). Am häufigsten wurden die Isolate aus Urinkulturen (57,1 % aller Patientenfälle), gefolgt von positiv bebrüteten Blutkulturen (28,6 % aller Patientenfälle) gewonnen (Abbildung 4). In anderen Fällen konnte eine *C. auris* Besiedlung auf der Oberfläche von künstlich einliegendem Material, wie einem ZVK oder einer infizierten Hüftprothese detektiert werden. Aber auch eine Besiedlung der Haut oder aber der Körperhöhlen war nachweisbar (Hamprecht et al., 2019).

## **3.2 Auswertung der Resistenztestungen**

### **3.2.1 Auswertung der YO-Platten/Mikrodilutionsplatten nach CLSI**

Um das Resistenzverhalten der *C. auris* Isolate zu untersuchen, wurden die von Thermo Fischer angebotenen Sensititre™ YeastOne™ YO10 AST Plates (YO-Platten) verwendet. Dies ermöglichte die gleichzeitige Testung von neun verschiedenen Antimykotika. Bei der Auswertung der Platten orientierte man sich an den Vorgaben des Benutzerhandbuches – Instructions for Use – Thermo Scientific Sensititre YeastOne Susceptibility Plates (Thermo Fischer Scientific Inc., 2016).

Bei fünf der zwölf untersuchten Isolate (41,7 %) konnte ein Trailing-Effekt beobachtet werden (Abbildung 5). Hierunter versteht man ein vermindertes, jedoch weiterbestehendes Wachstum von Kulturen jenseits des identifizierten MHK-Wertes (Marcos-Zambrano et al., 2016). Lag ein solcher Effekt vor, erwies es sich oft als schwierig einen eindeutigen Cut-Off-Wert zu identifizieren. So wurde gemäß den Vorgaben von Thermo Fischer Scientific der erste eindeutige Farbwechsel im Vergleich zur Positivkontrolle als MHK-Wert festgelegt (Thermo Fischer Scientific Inc., 2016). In Tabelle 16 sind die ermittelten MHK-Werte aller untersuchten Isolate ersichtlich.



**Abbildung 5: Repräsentative Auswertung der YO-Platten für NRZ-2017-394-4 mit Trailing-Effekt**  
 Die Abbildung zeigt repräsentativ die bebrütete YO-Platte für das Isolat NRZ-2017-394-4. Der gelbe Kreis kennzeichnet den abgelesenen MHK-Wert. In der Tabelle sind die dazugehörigen Zahlenwerte angegeben. Zur Ermittlung der MHK wurde das erste Well abgelesen, bei dem es zu einer eindeutigen Blaufärbung (Wachstumsminderung) im Vergleich zur Positivkontrolle kam. Bei einem auftretenden Trailing-Effekt wurde hingegen der erste eindeutige Farbwechsel im Vergleich zur Positivkontrolle als MHK-Wert gewertet. Für die Wirkstoffe Posaconazol (PZ) und Voriconazol (VOR) liegt ein Trailing-Effekt vor. Ersichtlich wird dies durch die unterschiedlichen Wachstumsraten des Hefepilzes (sowohl Blau- wie Lilatöne) jenseits des festgelegten MHK-Wertes (gelber Kreis). Für die Antimykotika 5-Flucytosin und Fluconazol lagen die ermittelten MHK-Werte unter oder oberhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches. Zum Plattenbelegungsschema siehe Abbildung 1.

Betrachtet man die im YO-Platten-Verfahren ermittelten MHK-Werte für Anidulafungin, wiesen die meisten in Deutschland gesammelten Isolate niedrige MHK-Werte im Bereich von 0,12 bis 0,25  $\mu\text{g/ml}$  auf (Tabelle 16). Die Isolate NRZ-2017-505-1 (MHK-Anidulafungin: 1  $\mu\text{g/ml}$ ) und NRZ-2017-505-2 (MHK-Anidulafungin: 4  $\mu\text{g/ml}$ ) zeigten erhöhte MHK-Werte. Ein ähnliches Bild fand sich bei allen untersuchten Echinocandinen. Während die meisten Isolate für Micafungin (0,06  $\mu\text{g/ml}$  bis 0,12  $\mu\text{g/ml}$ ) und Caspofungin (0,06  $\mu\text{g/ml}$  bis 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) niedrige MHK-Werte aufwiesen, hoben sich die Werte der Isolate NRZ-2017-505-1 (4  $\mu\text{g/ml}$  und 2  $\mu\text{g/ml}$ ) und NRZ-2017-505-2 (8  $\mu\text{g/ml}$  und 4  $\mu\text{g/ml}$ ) deutlich von diesen ab. Eine Ausnahme stellte das Isolat NRZ-2015-214 dar, welches mit einem MHK-Wert von >8  $\mu\text{g/ml}$  für Caspofungin oberhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches lag. Allerdings befanden sich die Werte für Anidulafungin und Micafungin im niedrigen Bereich

(weniger als 0,25 µg/ml), so dass dieses Isolat dennoch als Echinocandin-sensitiv gewertet wurde.

Bei der Untersuchung der für Amphotericin B ermittelten MHK-Werte zeigte sich für die meisten Isolate ein einheitliches Bild. Die Werte lagen überwiegend bei 0,5 bis 1 µg/ml. Die Isolate NRZ-2015-214, NRZ-2017-394-3, NRZ-2017-394-5 und NRZ-2017-505-3 wiesen hierbei die höchsten Werte mit 2 µg/ml auf (Tabelle 16). Auffällig war hier, dass die Isolate NRZ-2017-394-1 und NRZ-2017-394-2 eine niedrigere MHK von 0,5 µg/ml aufwiesen. Deren Folgeisolate NRZ-2017-394-3, NRZ-2017-394-4 und NRZ-2017-394-5 wiesen hingegen erhöhte Werte auf (2 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml), obwohl jene Proben von demselben Patienten gewonnen wurden (Abbildung 4, Tabelle 16). In ähnlicher Weise unterschied sich das Isolat NRZ-2017-505-3 von seinen Vorisolaten (Tabelle 16).

Betrachtet man die unter Testung der Triazol-Antimykotika ermittelten MHK-Werte, fielen bei nahezu allen gesammelten Isolaten sehr hohe Werte für Fluconazol auf (von 64 µg/ml bis  $\geq 256$  µg/ml). Lediglich ein Isolat (NRZ-2017-394-2) wies einen deutlich niedrigeren Wert von 8 µg/ml auf. Für sieben Isolate (1 µg/ml bis 2 µg/ml) zeigten sich im Vergleich zu den restlichen Proben (0,12 µg/ml bis 0,5 µg/ml) erhöhte MHK-Werte für Voriconazol. Am empfindlichsten zeigten sich die untersuchten Pilze gegenüber den Wirkstoffen Itraconazol und Posaconazol. Keines der Isolate wies hier erhöhte MHK-Werte auf (Tabelle 16).

Für 5-Flucytosin konnte lediglich für das Isolat NRZ-2017-505-3 ein erhöhter Wert (16 µg/ml) detektiert werden (Tabelle 16).

**Tabelle 16: MHK-Werte für YO-Platten**

Isolat	AND	MF	CAS	FC	PZ	VOR	IZ	FZ	AB
DSMZ 21092	0,06	0,03	0,06	0,12	0,03	0,03	0,06	4	0,5
NRZ-2015- 214	0,25	0,12	<b>&gt;8</b>	<0,06	0,12	0,5	0,25	<b>&gt;256</b>	<b>2</b>
NRZ-2017- 288	0,12	0,12	0,25	<0,06	0,03	0,25	0,06	<b>128</b>	1
NRZ-2017- 367	0,12	0,06	0,12	0,12	0,25	<b>1</b>	0,25	<b>&gt;256</b>	1
NRZ-2017- 394-1	0,12	0,12	0,25	0,12	0,015	0,25	0,06	<b>64</b>	0,5
NRZ-2017- 394-2	0,12	0,12	0,5	0,12	0,03	0,12	0,06	8	0,5
NRZ-2017- 394-3	0,25	0,12	0,5	<0,06	0,06	<b>1</b>	0,25	<b>&gt;256</b>	<b>2</b>
NRZ-2017- 394-4	0,12	0,12	0,25	<0,06	0,03	0,5	0,12	<b>&gt;256</b>	1
NRZ-2017- 394-5	0,12	0,12	0,5	<0,06	0,06	<b>1</b>	0,12	<b>&gt;256</b>	<b>2</b>
NRZ-2017- 505-1	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	0,12	0,25	<b>1</b>	0,25	<b>&gt;256</b>	1
NRZ-2017- 505-2	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<0,06	0,12	<b>1</b>	0,25	<b>&gt;256</b>	1
NRZ-2017- 505-3	0,25	0,12	0,5	<b>16</b>	0,25	<b>2</b>	0,25	<b>&gt;256</b>	<b>2</b>
NRZ-2017- 545	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	<b>2</b>	0,25	<b>&gt;256</b>	1

Abweichend hohe Werte sind fett gedruckt. Die angezeigten Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Konzentration in µg/ml. (n=1)

### 3.2.2 Auswertung der Mikrodilutionsplatten nach EUCAST

Die Mikrodilutionstestungen nach EUCAST wurden zunächst mit dem Wirkstoff Caspofungin durchgeführt. Für den Großteil der Isolate zeigte sich ein Wachstum bei untypisch hohen Konzentrationen (>64 µg/ml). Bei niedrigen Konzentrationen hingegen konnte kein Wachstum beobachtet werden (Abbildung 6). Das Bild, welches sich bei der Untersuchung der Platten zeigte, ähnelte stark einem Effekt, den man als paradoxes Wachstum bezeichnet (Hall et al., 1988). Ausgenommen war hier der Referenzstamm

*C. krusei* CFI4 (Tabelle 17). Mit zunehmender Bebrütungsdauer konnte man in dem von dem EUCAST vorgeschlagenen Inkubationszeitraum von 24 bis 48 h bei 62,5 % der Isolate ein Wachstum bei allen getesteten Wirkstoffkonzentrationen (von 0 bis 64 µg/ml) beobachten (Abbildung 6). Die restlichen Isolate zeigten allesamt einen MW-MHK-Wert von 2 µg/ml. Somit lag der Großteil der dokumentierten MHK-Werte weit über den Ergebnissen der beiden anderen Testverfahren (Tabelle 16, Tabelle 17, Tabelle 21). Lediglich für das Isolat NRZ-2017-505-1 konnte hier ein Wert ermittelt (2 µg/ml) werden, welcher in etwa mit dem Ergebnis des YO-Platten-Verfahrens (1 µg/ml) übereinstimmte.



**Abbildung 6: Zeitpunktabhängiges Wachstum im Mikrodilutionsverfahren nach EUCAST ohne Resazurin mit Caspofungin als Wirkstoff**

Hier wurde repräsentativ das Wachstumsverhalten für ein Isolat (NRZ-2017-394-1) unter der Testung von Caspofungin im Mikrodilutionsverfahren nach EUCAST dargestellt. Es handelt sich um einen Zusammenschnitt. Die MHK-Werte wurden zu drei Zeitpunkten bestimmt (18 h, 24 h und 48 h). Zu den Zeitpunkten 18 h und 24 h zeigt sich ein paradoxes Wachstum. Im Zeitfenster von 18 h bis 48 h konnte für die meisten Isolate weiterhin eine Wachstumszunahme in den einzelnen Wells beobachtet werden. Beim Erreichen einer Bebrütungsdauer von 48 h waren schließlich bei einem Großteil der Isolate, so wie in diesem Beispiel gezeigt, alle Wells bewachsen. \* Die angezeigten Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Konzentration in µg/ml.



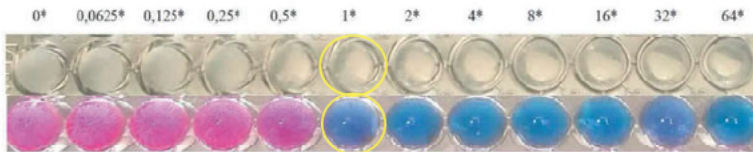
**Tabelle 17: MHK-Werte für Mikrodilutionstest nach EUCAST mit Caspofungin**

Isolat	VR I	VR II	VR III	MW-MHK±ST ABW bei n=3
<i>C. krusei</i> CFI4	1	2	2	1±0
DSMZ 21092	1	1	1	1±0
NRZ-2015-214	>64	>64	>64	>64±0
NRZ-2017-288	1	2	0,5	2±0,76
NRZ-2017-367	>64	>64	>64	>64±0
NRZ-2017-394-1	>64	>64	>64	>64±0
NRZ-2017-394-2	>64	>64	>64	>64±0
NRZ-2017-394-3	>64	>64	>64	>64±0
NRZ-2017-505-1	1	2	2	2±0,58
NRZ-2017-505-2	>64	>64	>64	>64±0
NRZ-2017-505-3	>64	>64	>64	>64±0
NRZ-2017-545	1	2	1	2±0,58

Eine Beurteilung der ermittelten Werte war aufgrund des Wachstumsverhaltens unter Caspofungin schwierig. Auch die dokumentierten Werte für den Referenzstamm *C. krusei* CFI4 konnten nicht weiter eingeordnet werden, da das EUCAST für die Testung von Caspofungin keine MHK-Werte zur Qualitätskontrolle zur Verfügung stellt (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020). MW: Mittelwert. STABW: Standardabweichung. VR: Versuchsreihe. Abweichend hohe Werte sind fett gedruckt. Die angezeigten Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Konzentration in µg/ml bei 48 h Inkubation. (n=3)

Ohne zuvor definierte klinische Breakpoints, war hier eine verlässliche Einschätzung der Werte, besonders im Hinblick auf die große Zahl von Isolaten mit sehr hohen MHK-Werten, schwierig. Aus diesem Grund wurde der Versuch mit dem Echinocandin Anidulafungin wiederholt. Zudem wurde das Verfahren um Resazurin als Indikator für beschädigte Zellwände und die damit verbundenen Zellvitalität erweitert. Das von dem EUCAST vorgegebene Verfahren sieht eine MHK-Bestimmung anhand einer 50-prozentigen Wachstumsminderung via Photometer vor. Ein Photometer stand für diese Arbeit nicht zur Verfügung. Durch die Zugabe von Resazurin war hingegen eine optische Auswertung möglich. In dieser Arbeit konnten für EUCAST-Ansätze mit/ohne Resazurin vergleichbare MHK-Werte beobachtet werden (Abbildung 7, Tabelle 18).

In Studien konnte ebenso gezeigt werden, dass eine Erweiterung des EUCAST Verfahrens um Resazurin für diverse Pilze zu gleichwertigen MHK-Ergebnissen führt und eine optische Auswertung ermöglicht (Yamaguchi et al., 2002; Markantonatou et al., 2020). So wurden die weiteren Versuche mit Resazurin durchgeführt. Mit Anidulafungin als Wirkstoff und der Zugabe von Resazurin konnten für die meisten Isolate Ergebnisse erzielt werden, die mit dem YO-Platten-Verfahren vergleichbar waren. Die ermittelten MHK-Werte sind in Tabelle 18 und 19 ersichtlich.



**Abbildung 7: Vergleich Microdilution nach EUCAST (mit/ohne Resazurin)**

Hier wurde repräsentativ die Testung des Isolats NRZ-2017-505-3 dargestellt. Die obere Reihe wurde ohne Resazurin durchgeführt. In der unteren Reihe kam Resazurin zum Einsatz. Die mit gelben Kreisen umrahmten Wells kennzeichnen die abgelesenen MHK-Werte. Für das Verfahren ohne Resazurin wurde das erste Well mit einer Wachstumsminderung von >50 % abgelesen. Die Auswertung erfolgte optisch und nicht durch Photometrie wie von EUCAST vorgegeben. Für das Verfahren mit Resazurin wurde der erste Farbumschlag von Rosa zu Blau gewertet. Hier konnten für beide Verfahren dieselben MHK-Werte abgelesen werden. Ein Vorteil des Verfahrens mit Resazurin bestand in der einfacheren Bestimmung von Cut-Off Werten durch eindeutige Farbumschläge. \* Die angezeigten Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Konzentration in µg/ml.

Der für den Referenzstamm *C. krusei* CF14 ermittelte MHK-Wert lag unterhalb der kleinsten getesteten Antimykotika-Konzentration von 0,0625 µg/ml. Vergleicht man hiermit die von dem EUCAST definierten MHK-Werte zur Qualitätskontrolle, lag der Wert in dem vorgeschlagenen Intervall von 0,016 bis 0,06 µg/ml (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020). Der Referenzstamm entsprach somit den Kriterien der Qualitätskontrolle. Betrachtet man die gemittelten MHK-Werte der *C. auris* Isolate, so befinden sich diese meist in einem Bereich von 0,0625 bis 0,125 µg/ml (Tabelle 18). Sechs Isolate unterscheiden sich somit nur gering von dem MW-MHK-Wert des japanischen Referenzstammes DSMZ 21092 (MW-MHK: 0,0625 µg/ml) oder den im YO-Plattenverfahren ermittelten Werten für dieselben Isolate

(0,125 bis 0,25 µg/ml) (Tabelle 16). Für drei Isolate konnten allerdings sehr hohe MW-MHK-Werte von 2 bis 64 µg/ml detektiert werden, die sich deutlich von den übrigen Isolaten in der Mikrodilutionstestung nach EUCAST abhoben (Tabelle 18). Bei diesen handelte es sich um das Isolat NRZ-2017-505-1 und dessen Folgeisolate NRZ-2017-505-2 und NRZ-2017-505-3. Erhöhte Werte konnten hier auch im YO-Platten-Verfahren für NRZ-2017-505-1 und NRZ-2017-505-2 ermittelt werden, allerdings in deutlich geringerer Ausprägung. Das Isolat NRZ-2017-505-3 wies jedoch keinen erhöhten MHK-Wert in der YO-Platten-Testung auf (Tabelle 19).

Tabelle 18: MHK-Werte für Mikrodilutionstest nach EUCAST mit Anidulafungin (mit/ohne Resazurin)

Isolat	VR I (ohne Resazurin)	VR II (mit Resazurin)	VR III (mit Resazurin)	VR IV (mit Resazurin)	MW-MHK±ST ABW bei n=4 (in µg/mL)
<i>C. krusei</i> CFI4	<0,0625	<0,0625	<0,0625	<0,0625	<0,0625±0
DSMZ 21092	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625±0
NRZ-2015-214	0,25	0,5	0,125	0,125	0,25±0,18
NRZ-2017-288	0,125	0,25	0,0625	0,0625	0,125±0,09
NRZ-2017-367	0,125	0,0625	0,0625	0,5	0,25±0,21
NRZ-2017-394-1	0,125	0,25	0,0625	0,0625	0,125±0,09
NRZ-2017-394-2	0,125	0,25	0,125	0,0625	0,25±0,08
NRZ-2017-394-3	0,25	0,5	0,125	0,125	0,25±0,18
NRZ-2017-505-1	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>32±10,1</b>
NRZ-2017-505-2	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64±0</b>
NRZ-2017-505-3	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2±0,58</b>
NRZ-2017-545	0,5	0,0625	0,0625	1	0,5±0,45

Dargestellt sind die ermittelten MHK-Werte für zehn gesammelte *C. auris* Isolate. Das *C. auris* Isolat DSMZ 21092 und das Isolat *C. krusei* CFI4 dienen als Referenzstämme. Mittelwert gerundet (MW). Standardabweichung gerundet (STABW). VR (Versuchsreihe). Abweichend hohe Werte sind fett gedruckt. Die angezeigten Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Konzentration in µg/ml. (n=4)

**Tabelle 19: Vergleich der Echinocandin-MHK-Werte für das YO-Platten- und Mikrodilutionsverfahren nach EUCAST**

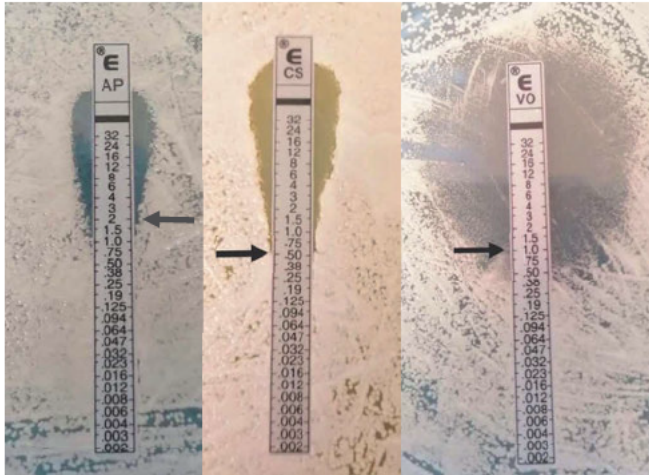
Isolat	MHK AND YO- Platten	MH-MHK AND MD nach EUCAST	MHK CAS YO- Platten	MH-MHK CAS MD nach EUCAST	MHK MF YO-Platten
NRZ-2017-505-1	1	32	2	2	4
NRZ-2017-505-2	4	>64	4	>64	8
NRZ-2017-505-3	0,25	2	0,5	>64	0,12
NRZ-2015-214	0,25	0,25	>8	>64	0,12

Die ermittelten Anidulafungin-MHK-Werte im Mikrodilutionsverfahren nach EUCAST der Isolate NRZ-2017-505-1 und NRZ-2017-505-2 erschienen im Gegensatz zu den YO-Platten stark erhöht. Jedoch hoben sich jene Isolate im YO-Platten-Verfahren ebenso deutlich von den übrigen Isolaten ab (Tabelle 16, Tabelle 18). Die Caspofungin-MHK-Werte der hier dargestellten Isolate erwiesen sich im Mikrodilutionsverfahren nach EUCAST als unüblich hoch und korrelierten nicht mit den Ergebnissen des YO-Platten-Verfahrens. Die einzige Ausnahme stellt hier das Isolat NRZ-2017-505-1 dar. Bei der Testung von Micafungin konnten im YO-Platten-Verfahren erhöhte Werte für NRZ-2017-505-1 und NRZ-2017-505-2 festgestellt werden. MD: Mikrodilutionsplatten nach EUCAST. Abweichend hohe Werte sind fett gedruckt. Die angezeigten Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Konzentration in µg/ml.

Zusammenfassend erscheint das Mikrodilutionsplatten-Verfahren nach EUCAST bei der Testung von Caspofungin wenig verlässliche Ergebnisse zu generieren. Die Testung von Anidulafungin erwies sich dem YO-Platten-Verfahren als vergleichbar.

### 3.2.3 Auswertung des E-Test-Verfahrens

Um die bisher ermittelten MHK-Werte mit dem Ergebnis eines weiteren standardisierten Tests zu vergleichen, wurden im Anschluss Epsilometertests durchgeführt. Hierbei wurde der Fokus auf jene Isolat-Reihen gelegt, welche aus Erst- und Folgeisolaten bestehen (NRZ-2017-394/1-5 und NRZ-2017-505/1-3). Das Isolat NRZ-2017-545 diente als ein Vertreter der Einzelisolate. Im Falle eines auftretenden Trailing-Effekts wurden die MHK-Werte nach Protokoll ab einer Wachstumsminderung von  $\geq 80\%$  abgelesen (bioMérieux, 2013). Die E-Teststreifen wurden optisch ausgewertet (Abbildung 8), die Ergebnisse in Tabelle 20, 21 und 22 zusammengefasst und mit den Werten des YO-Platten-Verfahrens verglichen.



**Abbildung 8: Repräsentative Auswertung des E-Test-Verfahrens**

Bei dem hier abgebildeten repräsentativen *C. auris* Isolat handelt es sich um NRZ-2017-394-2 angezüchtet auf einer RPM1-Agarplatte. Es wurden jeweils Tests mit Amphotericin B-, Caspofungin- und Voriconazol-Teststreifen (AP-, CS- und VO-Streifen) durchgeführt. Die schwarzen Pfeile zeigen die abgelesenen MHK-Werte an (AP-Streifen: 2 µg/ml, CS-Streifen: 0,5 µg/ml, VO-Streifen: 1 µg/ml). Für Voriconazol ist in diesem Beispiel ein schwach ausgebildeter Trailing-Effekt mit wachsenden Mikrokolonien im Halobereich rund um den Teststreifen erkennbar.

Bei der Auswertung der Amphotericin B Testreihe war auffällig, dass die Werte im E-Test-Verfahren im Allgemeinen deutlich höher lagen. Hierbei konnten für die YO-Platten Werte zwischen 0,5 µg/ml und 2 µg/ml und für die E-Teststreifen zwischen 1,5 µg/ml und 4 µg/ml ermittelt werden. Bei den Isolaten NRZ-2017-394-1 und NRZ-2017-394-2 fanden sich bei den YO-Platten (jeweils 0,5 µg/ml) im Gegensatz zu den E-Teststreifen (1,5 µg/ml und 2 µg/ml) keine erhöhten MHK-Werte. Bei beiden Verfahren wiesen die Isolate NRZ-2017-505-3 und NRZ-2017-394-3 die höchsten MHK-Werte unter den getesteten Hefepilzen auf (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Vergleich Amphotericin B-MHK-Werte für das E-Test- und YO-Platten-Verfahren**

Isolat	MHK AB <b>E-Test</b>	MHK AB <b>YO-Platten</b>
NRZ-2017-394-1	<b>1,5</b>	0,5
NRZ-2017-394-2	<b>2</b>	0,5
NRZ-2017-394-3	<b>4</b>	<b>2</b>
NRZ-2017-394-4	<b>3</b>	<b>1</b>
NRZ-2017-394-5	<b>3</b>	<b>2</b>
NRZ-2017-505-1	<b>3</b>	<b>1</b>
NRZ-2017-505-2	<b>2</b>	<b>1</b>
NRZ-2017-505-3	<b>4</b>	<b>2</b>
NRZ-2017-545	<b>1,5</b>	<b>1</b>

Abweichend hohe Werte sind fett gedruckt. Die angezeigten Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Konzentration in µg/ml.

Betrachtet man die Ergebnisse der Caspofungin-Testreihe, konnten bei den meisten Isolaten MHK-Werte zwischen 0,5 µg/ml und 0,75 µg/ml festgestellt werden. Damit lagen die Werte im Vergleich zu den YO-Platten (0,12 µg/ml bis 0,5 µg/ml) nur minimal höher. Abweichende Werte fanden sich bei den E-Teststreifen für die Isolate NRZ-2017-394-4 und NRZ-2017-394-5 (jeweils 1 µg/ml), welche bei den YO-Platten etwas niedriger lagen (0,25 und 0,5 µg/ml). Für die Isolate NRZ-2017-505-1 und NRZ-2017-505-2 konnten in beiden Testverfahren MHK-Werte ermittelt werden, welche im Vergleich zu den anderen Isolaten erhöht waren. Der Grad der Abweichung war hierbei bei den YO-Platten (2 µg/ml und 4 µg/ml) stärker ausgeprägt als bei den E-Teststreifen (1 µg/ml und 2 µg/ml) (Tabelle 21).

**Tabelle 21: Vergleich Caspofungin-MHK-Werte für das E-Test- und YO-Platten-Verfahren**

Isolat	MHK CAS <b>E-Test</b>	MHK CAS <b>YO-Platten</b>
NRZ-2017-394-1	0,5	0,25
NRZ-2017-394-2	0,5	0,5
NRZ-2017-394-3	0,75	0,5
NRZ-2017-394-4	<b>1</b>	0,25
NRZ-2017-394-5	<b>1</b>	0,5
NRZ-2017-505-1	<b>1</b>	<b>2</b>
NRZ-2017-505-2	<b>3</b>	<b>4</b>
NRZ-2017-505-3	0,75	0,5
NRZ-2017-545	0,75	0,12

Abweichend hohe Werte sind fett gedruckt. Die angezeigten Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Konzentration in µg/ml.

Mit den Voriconazol-Teststreifen wurde ein Azol-Antimykotikum untersucht. Auch hier lagen die abgelesenen MHK-Werte tendenziell höher als in den YO-Platten-Versuchen. Für sechs der untersuchten Isolate konnten hohe MHK-Werte mit 1 µg/ml bis 4 µg/ml festgestellt werden. Die vier Isolate NRZ-2017-394-3, NRZ-2017-505-1, NRZ-2017-505-3 und NRZ-2017-545 zeigten auch im YO-Platten-Verfahren (1 µg/ml bis 2 µg/ml) erhöhte Werte (Tabelle 22). Dabei wies das Isolat NRZ-2017-505-3 in beiden Verfahren die jeweils höchsten abgelesenen MHK-Werte auf (2 µg/ml beziehungsweise 4 µg/ml). Größere Abweichungen konnten für die Isolate NRZ-2017-394-2, NRZ-2017-394-4 und NRZ-2017-394-5 ermittelt werden (Tabelle 22). Bei den letzten beiden Isolaten erschwerte ein stark auftretender Trailing-Effekt die Auswertung der Platten. Dies könnte die beobachteten MHK-Differenzen erklären.



**Tabelle 22: Vergleich Voriconazol-MHK-Werte für das E-Test- und YO-Platten-Verfahren**

Isolat	MHK VOR <b>E-Test</b>	MHK VOR <b>YO-Platten</b>
NRZ-2017-394-1	0,50	0,25
NRZ-2017-394-2	<b>1</b>	0,12
NRZ-2017-394-3	<b>2</b>	<b>1</b>
NRZ-2017-394-4	<b>2</b>	0,5
NRZ-2017-394-5	0,38	<b>1</b>
NRZ-2017-505-1	<b>1,5</b>	<b>1</b>
NRZ-2017-505-2	0,75	<b>1</b>
NRZ-2017-505-3	4	<b>2</b>
NRZ-2017-545	<b>1</b>	<b>2</b>

Abweichend hohe Werte sind fett gedruckt. Die angezeigten Zahlenwerte entsprechen der jeweiligen Konzentration in µg/ml.

Insgesamt betrachtet zeigten die E-Teststreifen mit wenigen Ausnahmen höhere MHK-Werte an, waren aber mit den Ergebnissen des YO-Platten-Verfahrens gut vergleichbar. Meist betrafen die MHK-Abweichungen nur 1 bis 2 Konzentrationsstufen innerhalb des jeweiligen Testverfahrens.

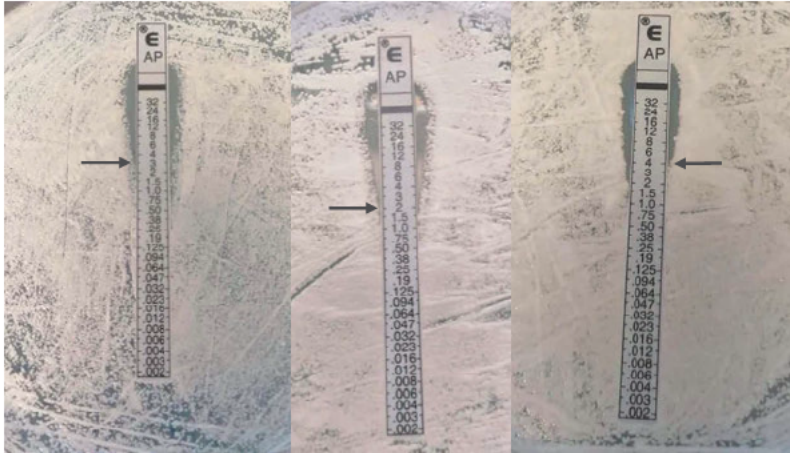
### **3.2.4 Ergebnisse der AFST bei vorbehandelten Patienten**

Zwei der drei behandelten Patienten sind durch eine antimykotische Therapie genesen. Patient Nr. 1 wurde durch ein nicht näher beschriebenes Echinocandin-Antimykotikum erfolgreich behandelt. Das von Patient Nr. 1 gewonnene Isolat NRZ-2015-214 wies im YO-Platten-Verfahren für Anidulafungin (0,25 µg/ml) und Micafungin (0,12 µg/ml) MHK-Werte auf, die im Vergleich zu den anderen Isolaten nicht erhöht waren. Lediglich für Caspofungin konnte bei diesem Isolat ein deutlich erhöhter MHK-Wert von >8 µg/ml detektiert werden (Tabelle 16). Ob hier ein Zusammenhang zur Vortherapie besteht, konnte nicht in Erfahrung gebracht werden.

Patient Nr. 5 wurde mit Amphotericin B behandelt. Die führte zu einer Besserung des klinischen Zustands (Tabelle 15). Durch die YO-Platten-Testungen konnte für das Isolat NRZ-2017-367 ein MHK-Wert von 1 µg/ml festgestellt werden. Somit unterschied sich das Isolat nicht wesentlich von den übrigen Isolaten (MHK: 0,25 µg/ml bis 2 µg/ml)

(Tabelle 16). Damit kann aufgrund der erfolgreichen Behandlung eher von einer Sensitivität ausgegangen werden.

Auffällig war zudem die Auswertung des Resistenzverhaltens von Isolat NRZ-2017-505-1 und dessen Folgeisolaten NRZ-2017-505-2 und -3. Patient Nr. 6, von welchem die Isolate gewonnen wurden, erhielt eine 6-monatige antimykotische Kombinationstherapie (Tabelle 15). Bei den YO-Platten-Versuchen war gegenüber den eingesetzten Wirkstoffen Amphotericin B (Anstieg von 1 µg/ml auf 2 µg/ml) und Voriconazol (Anstieg von 1 µg/ml auf 2 µg/ml) ein geringer Anstieg der MHK-Werte von Erst- zu Letztisolat zu beobachten (Tabelle 16). Bei dem E-Test-Verfahren kam es ebenso zu einem Anstieg der MHK Werte für Amphotericin B (von 3 µg/ml auf 4 µg/ml) und einer deutlichen Erhöhung bei der Testung von Voriconazol (von 1,5 µg/ml auf 4 µg/ml). Das Isolat NRZ-2017-505-2 wies hierbei niedrigere Werte (Amphotericin B-MHK: 2 µg/ml; Voriconazol-MHK: 0,75 µg/ml) als sein Vorgänger- und Folgeisolat auf (Abbildung 9, Abbildung 10). Für die untersuchten Isolate NRZ-2017-505-1 und NRZ-2017-505-2 zeigten sich sowohl im E-Test- wie im YO-Platten-Verfahren erhöhte Werte für alle getesteten Echinocandine. Das Isolat NRZ-2017-505-3 hingegen wies in keinem der beiden Verfahren erhöhte MHK-Werte für Echinocandine auf (Tabelle 16, Tabelle 21). Jenes Isolat zeigte jedoch als einziges unter allen untersuchten Isolaten eine erhöhte MHK gegenüber 5-Flucytosin (Tabelle 16). Zusammenfassend zeigte NRZ-2017-505-3 ein Resistenzverhalten, welches stark von den Vorgängerisolaten abwich.



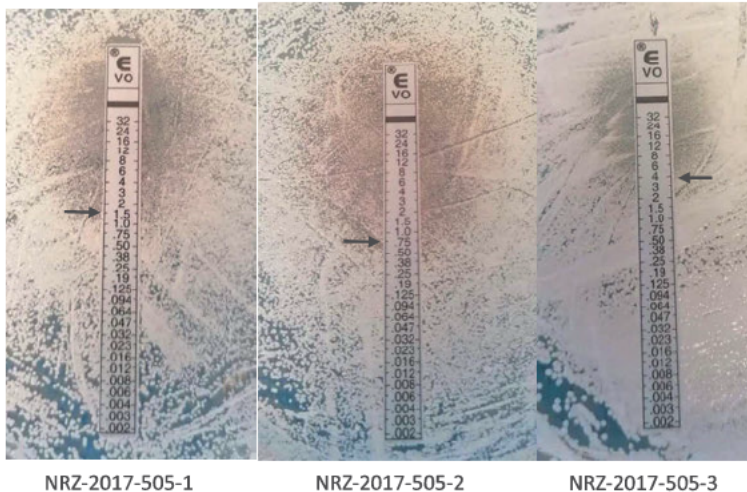
NRZ-2017-505-1

NRZ-2017-505-2

NRZ-2017-505-3

**Abbildung 9: Abweichung der MHK-Werte bei AP-Streifen für NRZ-2017-505/1-3**

Dargestellt ist die Abweichung der MHK-Werte unter Amphotericin B-Einsatz (AP-Streifen) bei Patient 6. Abgebildet sind die Ergebnisse für Isolat NRZ-2017-505-1 (MHK-Wert: 3 µg/ml), NRZ-2017-505-2 (MHK-Wert: 2 µg/ml) und NRZ-2017-505-3 (MHK-Wert: 4 µg/ml)



**Abbildung 10: Abweichung der MHK-Werte bei VO-Streifen für NRZ-2017-505/1-3**  
 Dargestellt ist die Abweichung der MHK-Werte unter Voriconazol-Behandlung (VO-Streifen) bei Patient 6. Abgebildet sind die Ergebnisse für Isolat NRZ-2017-505-1 (MHK-Wert: 1,5 µg/ml), NRZ-2017-505-2 (MHK-Wert: 0,75 µg/ml) und NRZ-2017-505-3 (MHK-Wert: 4 µg/ml)

### 3.3 Ergebnisse der genetischen Untersuchung

#### 3.3.1 Untersuchung der Hot Spot Regionen im *C. auris* *FKSI*-Gen

Die für die PCR benötigten Oligonukleotidprimer wurden so ausgewählt, dass jeweils die erste und die zweite Hot Spot-Region des *C. auris* *FKSI*-Gens amplifiziert werden konnte. Die Längen der PCR-Produkte unterschieden sich für den *FKSI*-Hot Spot 1 und *FKSI*-Hot Spot 2 nur geringfügig voneinander. Mit den genannten Hot Spots wurden nur einzelne Teilabschnitte der gesamten *FKSI*-Region untersucht (Abbildung 11).



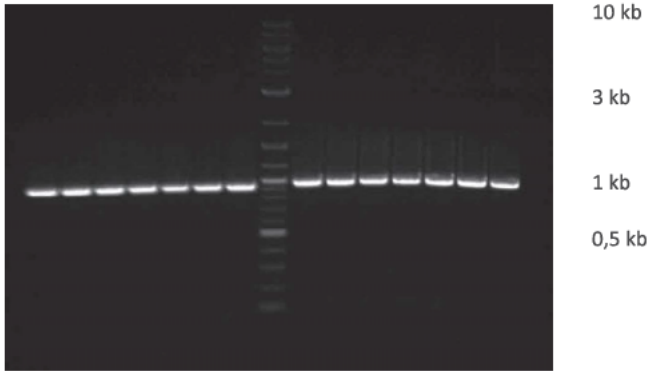
**Abbildung 11: Darstellung der Primer für den FKSI-Hot Spot 1-2 und Größe der abgelesenen PCR-Produkte**

Hier wurden die FKSI-Hot Spots 1 und -2 dargestellt. Das FKSI-Gen besitzt eine Länge von 5667 bp und liegt auf Chromosom 2 (Chr, 2). Der FKSI-Hot Spot 1 ist hierbei im Abschnitt 1903-1927 und der FKSI-Hot Spot 2 im Abschnitt 4048-4071 des FKSI-Gens zu finden. Die Primerpaare *CauFKSI-11 fwd/-rev* und *CauFKSI-12 fwd/-rev* markieren jeweils die Genabschnitte in denen der FKSI-Hot Spot 1 beziehungsweise FKSI-Hot Spot 2 enthalten sind.

Um die erhaltenen PCR-Produkte bezüglich ihrer Größe zu untersuchen, wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese durchgeführt (Abbildung 12). Konnten Produkte der erwünschten Größenordnung nachgewiesen werden, wurden die Proben zur Sanger-Sequenzierung an LGC Genomics verschickt.

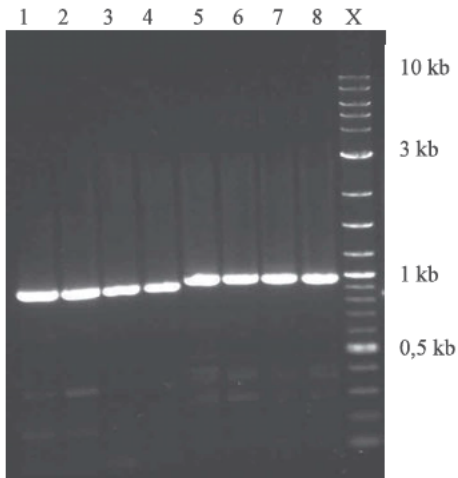
## Gelelektrophorese I:

1a 2a 3a 4a 5a 6a 7a X 1b 2b 3b 4b 5b 6b 7b



Bande	Isolat	Hotspot
1a	NRZ-2017-394-1	<i>FKSI</i> – Hot Spot 1
2a	NRZ-2017-394-2	<i>FKSI</i> – Hot Spot 1
3a	NRZ-2017-394-3	<i>FKSI</i> – Hot Spot 1
4a	NRZ-2015-u214	<i>FKSI</i> – Hot Spot 1
5a	NRZ-2017-288	<i>FKSI</i> – Hot Spot 1
6a	NRZ-2017-367	<i>FKSI</i> – Hot Spot 1
7a	DSMZ 21092	<i>FKSI</i> – Hot Spot 1
X	DNA- Leiter (10kb)	X
1b	NRZ-2017-394-1	<i>FKSI</i> – Hot Spot 2
2b	NRZ-2017-394-2	<i>FKSI</i> – Hot Spot 2
3b	NRZ-2017-394-3	<i>FKSI</i> – Hot Spot 2
4b	NRZ-2015-214	<i>FKSI</i> – Hot Spot 2
5b	NRZ-2017-288	<i>FKSI</i> – Hot Spot 2
6b	NRZ-2017-367	<i>FKSI</i> – Hot Spot 2
7b	DSMZ 21092	<i>FKSI</i> – Hot Spot 2

## Gelelektrophorese II:



Bande	Isolat	Hot Spot
1	NRZ-2017-505-1	<i>FKSI</i> – Hot Spot 1
2	NRZ-2017-545	<i>FKSI</i> – Hot Spot 1
3	NRZ-2017-505-2	<i>FKSI</i> – Hot Spot 1
4	NRZ-2017-505-3	<i>FKSI</i> – Hot Spot 1
5	NRZ-2017-505-1	<i>FKSI</i> – Hot Spot 2
6	NRZ-2017-545	<i>FKSI</i> – Hot Spot 2
7	NRZ-2017-505-2	<i>FKSI</i> – Hot Spot 2
8	NRZ-2017-505-3	<i>FKSI</i> – Hot Spot 2
X	DNA-Leiter (10kb)	X

**Abbildung 12: Geldokumentation der PCR-Produkte für *FKSI*-Hot Spot 1/2**

Dargestellt sind die Ergebnisse zweier getrennt voneinander durchgeführter Gelelektrophoresen (Gelelektrophorese I und Gelelektrophorese II). Die Banden zeigen die Größe der einzelnen PCR-Produkte für ausgewählte Isolate. Die Isolate und deren Positionierung sind jeweils in den Tabellen aufgeführt. Es wurden Primerpaare für den *FKSI*-Hot Spot 1/2 ausgewählt. Das amplifizierte PCR-Produkt für den *FKSI*-Hot Spot 1 sollte eine Länge von 935 bp aufweisen. Für Amplifikate des *FKSI*-Hot Spot 2 war eine Größe von 973 bp angestrebt. Passend hierzu wiesen alle in den Geldokumentationen dargestellten Isolate eine Länge von knapp unter 1 kb auf. Das Isolat DSMZ 21092 diente als Referenzstamm. Der Versuch wurde mit allen vorhandenen Isolaten durchgeführt. Es wurde eine 10 kb DNA-Leiter verwendet (Quick-Load® Purple 2-log DNA Ladder von New England Biolabs Inc.).

### 3.3.2 Detektierte Mutationen in *FKSI*

Bei zwei der zwölf untersuchten Isolate (16,7 %) konnte jeweils eine Punktmutation im *FKSI*-Hot Spot 1 detektiert werden, welche zu einer Aminosäuresubstitution im Gesamtprotein führte (Abbildung 13). Hierbei war bei beiden Isolaten Position 639 des entsprechenden Proteinabschnittes betroffen. Dies entspricht der Position 1915-1917 im *FKSI*-Gen (Abbildung 13). Bei dem Isolat NRZ-2017-505-1 führte dies zu einem Austausch der Aminosäure Serin gegen Tyrosin (S639Y). Im Falle des Isolats NRZ-2017-505-2 wurde Serin gegen Phenylalanin (S639F) getauscht (Tabelle 23). Bei NRZ-2017-505-2 handelt es sich um ein Folgeisolat von NRZ-2017-505-1. Das nächste Folgeisolat NRZ-2017-505-3 wies im Gegensatz zu seinen Vorgängern keine Mutation im *FKSI*-Hot Spot 1 auf. Weiterhin wurde der *FKSI*-Hot Spot 2 untersucht. In dieser Region konnte für kein Isolat eine Mutation detektiert werden.

Referenz	TTCTTGACTTTG <b>T</b> CCTTGAGAGATCCT
505-1	TTCTTGACTTTG <b>T</b> A <b>C</b> TTGAGAGATCCT
505-2	TTCTTGACTTTG <b>T</b> <b>T</b> CCTTGAGAGATCCT
505-3	TTCTTGACTTTG <b>T</b> CCTTGAGAGATCCT

Position der Basensubstitution:

*FKSI*-Gen: 1916

*FKSI*-Hot Spot 1: 14

#### Abbildung 13: Basensubstitution bei Mutationen im *FKSI* Hot Spot 1

Dargestellt sind die Basensequenzen des *FKSI*-Hot Spot 1 mit einer Gesamtlänge von 27 bp jeweils für das Referenzgenom B8441\_V2 und für die Isolate NRZ-2017-505-1/-2 und -3. Die für NRZ-2017-505-1 und -2 detektierten Mutationen fanden sich bei beiden Isolaten an Position 1916 des *FKSI*-Gens (Position 14 im *FKSI*-Hot Spot 1). Dadurch änderte sich das Codon TCC (kodierend für Serin, S) bei den Isolaten in TAC (kodierend für Tyrosin, Y) bzw. TTC (kodierend für Phenylalanin, F). Für das Isolat NRZ-2017-505-3 lag keine Mutation vor (Codon TCC).



Tabelle 23: Detektierte Mutationen in *FKSI* Hot Spot 1 Region mit Aminosäuresubstitution

<i>C. auris</i> Isolat	Detektierte Mutation in <i>FKSI</i> -Hot Spot 1	Detektierte Mutation in <i>FKSI</i> -Hot Spot 2
NRZ-2015-214	Keine	Keine
NRZ-2017-288	Keine	Keine
NRZ-2017-367	Keine	Keine
NRZ-2017-394-1	Keine	Keine
NRZ-2017-394-2	Keine	Keine
NRZ-2017-394-3	Keine	Keine
NRZ-2017-394-4	Keine	Keine
NRZ-2017-394-5	Keine	Keine
NRZ-2017-505-1	S639Y	Keine
NRZ-2017-505-2	S639F	Keine
NRZ-2017-505-3	Keine	Keine
NRZ-2017-545	Keine	Keine

### 3.3.3 Untersuchung der *ERG11*-Region

Für den *ERG11*-Genabschnitt wurde ebenfalls ein Primerpaar gewählt, welches für alle Isolate ein Genprodukt derselben Länge amplifizierte (Abbildung 14). Dieses PCR-Produkt umfasste das gesamte *ERG11*-Gen, so dass im Gegensatz zu den *FKS*-Sequenzierungen, die gesamte Sequenz von *ERG11* untersucht werden konnte.

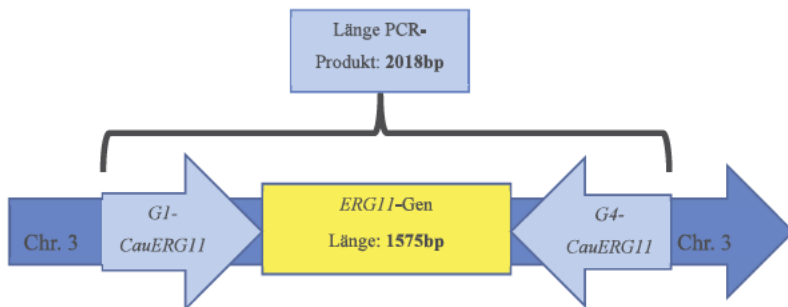
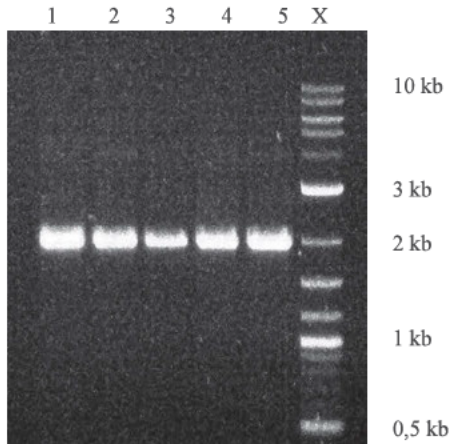


Abbildung 14: Darstellung des Primers für *ERG11*-Region und Größe des abgelesenen PCR-Produkt

Abgebildet ist die *ERG11*-Genregion, welche sich auf Chr. 3 befindet. Die *ERG11*-Region umfasst eine Länge von 1575 bp. Als Primer wurden *G1-CauERG11* und *G4-CauERG11* verwendet. Das entsprechende PCR-Produkt war 2018bp groß und umfasste den gesamten open reading frame (ORF) des *ERG11*-Gens.

Um die erhaltenen PCR-Produkte bezüglich ihrer Größe zu untersuchen, wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese durchgeführt (Abbildung 15). Konnten Produkte der erwünschten Größenordnung nachgewiesen werden, folgte eine Versendung zur Sanger-Sequenzierung an LGC Genomics.



Bande	Isolat
X	DNA-Leiter (10 kb)
1	NRZ-2017-394-1
2	NRZ-2017-394-2
3	NRZ-2017-394-3
4	NRZ-2017-394-4
5	NRZ-2017-394-5

**Abbildung 15: Geldokumentation der PCR-Produkte der *ERG11*-Region**

Hierbei handelt es sich um eine repräsentative Darstellung mit fünf von zwölf untersuchten Isolaten. Alle untersuchten Banden zeigten ein PCR-Produkt mit einer Länge von ungefähr 2000 bp. Dies stimmt mit einer angestrebten Größe von 2018 bp für die amplifizierte *ERG11*-Region (mit enthaltenem *ERG11*-Gen) überein. Der Versuch wurde mit allen zwölf vorhandenen Isolaten durchgeführt. Als DNA-Leiter wurde die Quick-Load® Purple 2-log DNA Ladder, 10 kb von New England Biolabs Inc. verwendet.

### 3.3.4 Detektierte Mutationen in *ERG11*

In Tabelle 24 sind die in *ERG11* detektierten Mutationen abgebildet. Bei allen untersuchten Isolaten konnten relevante Punktmutationen im *ERG11*-Gen entdeckt werden, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führten. Hierbei wiesen 8 Isolate (66,7 %) eine Mutation vom Typ Y132F auf, bei der es an Position 132 des *Erg11*-

Proteins zu einem Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin kam. Dies entspricht Position 394-396 im Gen. Bei drei Isolaten (25 %) lag die Mutation K143R mit einem Austausch von Lysin gegen Arginin an Position 143 des Proteins vor. Die Mutation befindet sich somit in Position 427 bis 429 im Gen. Bei einem Isolat wurde der Typ F126L mit einem Austausch von Phenylalanin gegen Leucin nachgewiesen. Dies entspricht Position 376 bis 378 im Gen (Abbildung 16).

Auffällig war hier, dass NRZ-2017-505-1 und NRZ-2017-505-2 eine Mutation des Typen K143R aufwiesen, während bei NRZ-2017-505-3 die Mutation Y132F vorlag. Alle drei Isolate wurden von demselben Patienten (Patient 6) gewonnen, wiesen aber unterschiedliche Mutationen in der Proteinsequenz des *ERG11*-Gens auf. Dies könnte möglicherweise auf einen anderen Stammhintergrund hindeuten.

Referenz	AAAGGTGTCATT <b>T</b> ACGACTGTCCCAAC
Mutation Y132F	AAAGGTGTCATT <b>T</b> TCGACTGTCCCAAC
Referenz	TTGATGGAGCAG <b>A</b> AGAAATTTGCTAAG
Mutation K143R	TTGATGGAGCAG <b>A</b> GGAAATTTGCTAAG
Referenz	ACCACTCCAGT <b>T</b> TCGGGAAAGGTGTC
Mutation F126L	ACCACTCCAGT <b>T</b> CTCGGGAAAGGTGTC

Position im *ERG11*-Gen:

Mutation Y132F: 395

Mutation K143R: 428

Mutation F126L: 376

#### **Abbildung 16: Basensubstitution bei Mutationen im *ERG11*-Gen**

Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt der *ERG11*-Genregion. Die abgebildeten Basensequenzen zeigen die jeweilige Region, in der die Mutationen Y132F, K143R und F126L beobachtet werden konnten. Die Mutationstypen wurden mit dem Referenzgenom B8441\_V2 verglichen. Dabei fand die Mutation Y132F an Position 395 im *ERG11*-Gen statt und führte zu einer Änderung des Codons von TAC (kodierend für Tyrosin, Y) in TTC (kodierend für Phenylalanin, F). Die Mutation K143R fand an Position 428 im *ERG11*-Gen statt und führte zu einer Änderung des Codons von AAG (kodierend für Lysin, K) in AGG (kodierend für Arginin, R). Die Mutation F126L fand an Position 376 im *ERG11*-Gen statt und führte zu einer Änderung des Codons von TTC (kodierend für Phenylalanin, F) in CTC (kodierend für Leucin, L).

**Tabelle 24: Mutationen in der *ERG11*-Region mit Aminosäuresubstitution**

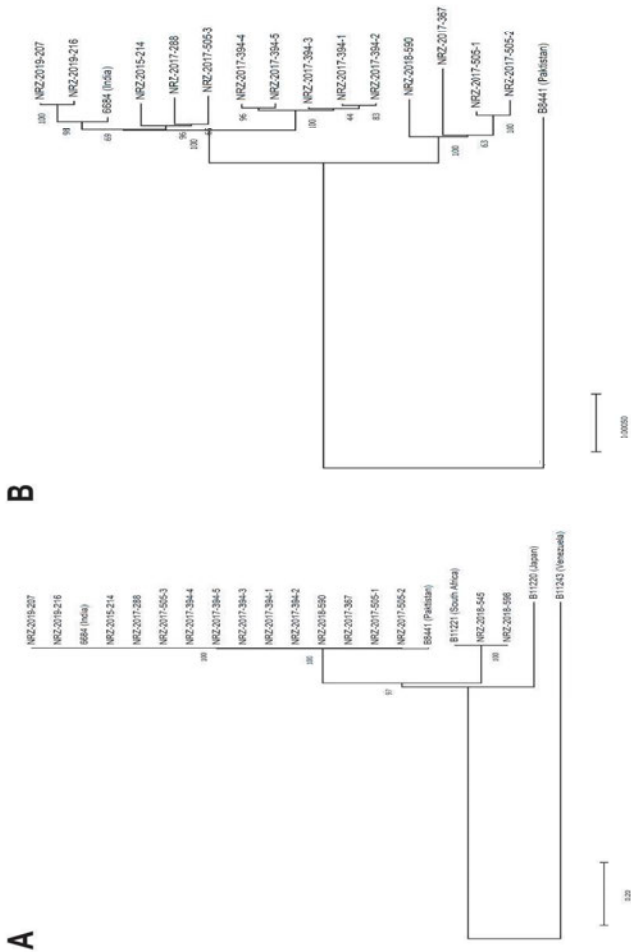
<b>C. auris Isolat</b>	<b>Detektierte Mutation in <i>ERG11</i>-Gen</b>
NRZ-2015-214	Y132F
NRZ-2017-288	Y132F
NRZ-2017-367	K143R
NRZ-2017-394-1	Y132F
NRZ-2017-394-2	Y132F
NRZ-2017-394-3	Y132F
NRZ-2017-394-4	Y132F
NRZ-2017-394-5	Y132F
NRZ-2017-505-1	K143R
NRZ-2017-505-2	K143R
NRZ-2017-505-3	Y132F
NRZ-2017-545	F126L

### **3.3.5 Verwandtschaft zu internationalen Isolaten und geographische Herkunft**

Basierend auf den Ergebnissen der Arbeit von Chow et al. konnten die *ERG11*-Sequenzdaten genutzt werden, um das Isolat NRZ-2017-545 mit der F126L-Mutation dem *C. auris* Clade III zuzuordnen (Abbildung 16). Die Mutationstypen Y132F und K143R, welche bei den anderen Stämmen auftraten, erlaubten keine weitere Zuordnung, da diese Mutationen in den Clades I und IV häufig auftreten (Chow et al., 2020).

Das Genom der hier untersuchten Stämme wurde auch im Rahmen eines anderen Projektes sequenziert. Die phylogenetische Analyse der Genomdaten erfolgte durch Dr. Dr. Michaela Herz (Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg) und Dr. Amelia Barber (Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie Hans-Knöll-Institut, Forschungsgruppe: Fungal Septomics). Dadurch wurde eine Einordnung der in Deutschland gewonnen Isolate in die vier bekannten Clades möglich (Abbildung 17). Passend zu den Ergebnissen der *ERG11*-Sequenzierungen, konnte das Isolat NRZ-2017-545, welches von Patient 7 gewonnen wurde, hierbei Clade III zugeordnet werden. Eine zuvor stattgefundene medizinische Behandlung in Kenia scheint hier in Zusammenhang zu stehen. Alle anderen Isolate (91,7%) zeigten eine nahe Verwandtschaft zu Referenzstämmen aus Indien und Pakistan und sind somit Clade I zugehörig (Abbildung 17). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass sich ein Großteil

der Patienten zuvor in Länder des Nahen oder Mittleren Ostens aufhielten. Keines der Isolate war Clade II oder Clade IV zugehörig.



**Abbildung 17: Phylogenetische Verwandtschaft und geographische Herkunft der Isolate**

Die Abbildung wurde im Rahmen eines anderen Projekts durch Dr. Dr. Michaela Herz und Dr. Amelia Barber erstellt. In Abbildung A sind die einzelnen Isolate nach ihrer genetischen Verwandtschaft geordnet dargestellt. Die Isolate wurden hierbei bezüglich ihrer phylogenetischen Distanz zu Referenzstämmen aus den vier bekannten Clades verglichen. Die Referenzstämme B8441 (Pakistan) und 6684 (Indien) fungierten hierbei als Vertreter des südasiatischen Clade I. B11220 gehört dem ostasiatischen Clade II, B11221 dem südafrikanischen Clade III und B11243 dem südamerikanischen Clade IV an. In Abbildung B wird näher bezüglich der genetischen Distanz zu den pakistanischen und indischen Subclade-Isolaten unterschieden, welche Bestandteile des asiatischen Clades sind. Die Zahlenwerte auf den Ästen geben die Bootstrap-Werte an. Bei den Isolaten NRZ-2019-207, NRZ-2019-216, NRZ-2018-590 und NRZ-2018-508 handelt es sich um Isolate, die seit 2019 in Deutschland gesammelt wurden und nicht Gegenstand dieser Arbeit waren. Eine Erlaubnis zur Veröffentlichung der gezeigten Grafik ist unter II. Abbildungsverzeichnis hinterlegt.

## 4. Diskussion

### 4.1 Vergleich mit weltweitem Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *C. auris* Isolate von insgesamt sechs Patienten gesammelt und bezüglich ihres Resistenzverhaltens und möglicher Mutationen in Resistenzgenen untersucht. Der Großteil dieser Patienten wurde zunächst in ausländischen Gesundheitseinrichtungen behandelt und anschließend in deutsche Krankenhäuser transferiert (Hamprecht et al., 2019). Die genetischen Untersuchungen der Isolate ermöglichten eine Zuordnung zu phylogenetischen Clades. Für die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Fälle liegt daher die Vermutung nahe, dass eine Infektion mit *C. auris* im Ausland erfolgte. Ähnliche Beobachtungen zeigten sich für *C. auris* Isolate, welche in den USA gesammelt wurden (Chow et al., 2018). Nach einer groß angelegten Metastudie von Chen et al. tritt eine Blutstrominfektion mit einem mittleren Anteil von 32 % als häufigste Manifestationsform einer *C. auris* Infektion auf (Chen et al., 2020). Für in Europa beobachtete Fälle werden geringere Raten von bis zu 18,0 % angegeben (Schelenz et al., 2016; Garcia-Bustos et al., 2020). In dieser Arbeit konnten *C. auris* Isolate bei 28,6 % aller Patienten in bebrüteten Blutkulturen festgestellt werden. Somit lag jene Rate über dem europäischen Mittel. Zu beachten ist allerdings, dass hier im Vergleich zu internationalen Studien eine deutlich geringe Anzahl an Fällen untersucht wurde. Am häufigsten wurde *C. auris* bei den hier vorliegenden Isolaten in Urinproben (57,1 %) nachgewiesen. Eine entscheidende Rolle könnten hierbei nach einer Studie von Rudramurthy et al. einliegende Harnröhrenkatheter einnehmen, welche in Indien bei 75,7 % aller ICU-pflichtigen Candidämien als möglicher Risikofaktor auftraten. Außerdem konnte der Keim auf Katheterspitzen von einliegenden ZVKs nachgewiesen werden (Rudramurthy et al., 2017; Chakrabarti et al., 2015). Eine solche Besiedlung fand sich in dem hier untersuchten Kollektiv ebenso bei einer Patientin. Somit könnten künstliche Eintrittspforten auch bei den in Deutschland nachgewiesenen Fällen einen nicht unerheblichen Einfluss auf das Kolonisierungsgeschehen haben. Als Vorerkrankungen und mögliche Risikofaktoren werden in der Literatur eine vorliegende Immunsuppression, Tumorleiden, Diabetes mellitus oder chronische Nierenleiden diskutiert (Rudramurthy et al., 2017; Garcia-Bustos et al., 2020). Bei den hier untersuchten Patienten stellten neurologische Erkrankungen mit 42,9 % die häufigste

Komorbidität dar. Zudem konnte eine Häufung operativer Eingriffe, welche in kurzem zeitlichem Abstand vor Probengewinn stattfanden, beobachtet werden (57,1 %). Operationen beziehungsweise der Aufenthalt auf intensivmedizinischen Stationen mit chirurgischem Schwerpunkt scheinen laut Literatur für die Entwicklung einer *C. auris* Besiedlung oder Infektion zu prädestinieren (Garcia-Bustos et al., 2020; Ruiz-Gaitan et al., 2018; Lee et al., 2011; Rudramurthy et al., 2017). Diese Erkenntnis könnte sich in der perioperativen Versorgung von Candidämie-Risikopatienten, insbesondere bei Herkunft aus Ländern mit hohen *C. auris* Fallzahlen, als nützlich erweisen. Die Gesamtmortalitätsangabe einer *C. auris* Infektion schwankt geographisch sehr stark und wird in Europa mit 20 % angegeben (Chen et al., 2020). Erstaunlicherweise ist nach aktuellem Wissenstand keiner der in Deutschland Betroffenen an einer *C. auris* Infektion verstorben (Stand 2022). Eine mögliche Erklärung könnte hier die geringe Fallzahl der untersuchten Patientenfälle sein. Das hier untersuchte Patientenkontingent war im Mittel 52 Jahre alt mit einer geringfügig höheren Rate an männlichen Erkrankten (57,1 %). Eine vergleichbare Datenlage findet sich auch in der Literatur mit einem Durchschnittsalter von 54 Jahren und einem männlichen Patientenanteil von 63,0 % (Lockhart et al., 2017; Rudramurthy et al., 2017).

#### **4.2 Methodik der Resistenztestverfahren im Vergleich**

Um die gesammelten *C. auris* Isolate bezüglich vorliegender Resistenzen zu untersuchen, wurden drei unterschiedliche Testverfahren ausgewählt (Mikrodilutionstestverfahren nach EUCAST, YO-Platten-Verfahren und E-Teststreifen). Bei den YO-Platten handelt es sich um eine dem CLSI M27-A2 Standard entsprechende, kolorimetrische Vorgehensweise zur Resistenztestung, welche sich für diverse *Candida*-Spezies als verlässliche Alternative zum E-Test oder anderen CLSI-konformen Verfahren etabliert hat (Lombardi et al., 2004). In den hier durchgeführten Untersuchungen wiesen die YO-Platten im Vergleich zu den anderen Testungen einige Vorteile auf. So konnten in jedem Versuch neun Antimykotika gleichzeitig getestet werden. Im Gegensatz zu den Mikrodilutionsplatten nach EUCAST war es weder notwendig Medien herzustellen noch Wirkstoffverdünnungen vorzunehmen, wodurch Fehlerquellen minimiert werden konnten. Ebenso ist mit dem alamarBlue™-Reagenz bereits ein Farbstoff zur



Einschätzung der Zellvitalität enthalten. Eine kolorimetrische Auswertung der MHK-Werte gestaltete sich unkompliziert, da im Gegensatz zu dem Mikrodilutionsplattenverfahren nach EUCAST (ohne Resazurin) keine photometrische Auswertung notwendig war. Lediglich ein bei den getesteten Azol-Antimykotika vorkommender Trailing-Effekt (bei 41,7 % der Isolate) erschwerte teilweise eine Ermittlung der MHK-Werte. Jener Effekt ist jedoch bei der Testung mit Azol-Antimykotika, besonders mit Fluconazol, nicht ungewöhnlich und in der Literatur beschrieben (Thermo Fischer Scientific Inc., 2016; Girmenia et al., 2000).

Die Herstellung der EUCAST-konformen Microdilutionsplatten orientierte sich an einem vorgegebenen Protokoll (Arendrup et al., 2017). Bei einer zuvor durchgeführten Testung mit Caspofungin konnte bei den meisten Isolaten ein paradoxes Wachstumsphänomen/Eagle-Effekt beobachtet werden. Laut Literatur tritt dieser Effekt häufig bei dem Einsatz von Echinocandinen auf und ist stark von dem verwendeten Testverfahren oder der getesteten Spezies abhängig (Vanstraelen et al., 2013). In einer Studie von Kordalewska et al. wurde die Ausbildung eines paradoxen Wachstums unter Einsatz von Caspofungin ebenfalls bei der Testung von *C. auris* Isolaten nachgewiesen (Kordalewska et al., 2018). In dem vorgeschlagenen Inkubationszeitraum von 24 bis 48 h zeigte sich für die hier untersuchten Isolate mit Eagle-Effekt eine Wachstumszunahme in den einzelnen Wells. So waren nach exakt 48 h Inkubation bei 62,5 % der Isolate alle vorhandenen Wells bewachsen (Wirkstoffkonzentration: 0 bis 64 µg/ml). Auch in der Literatur konnte bei einer Bebrütungsdauer von 48 h ein Wachstum bei allen getesteten Caspofungin-Konzentrationen detektiert werden (Kordalewska et al., 2018). Jenes Wachstum bei hohen Wirkstoffkonzentrationen ist möglicherweise auf die chemischen Eigenschaften von Caspofungin zurückzuführen. Das Antimykotikum ist dafür bekannt gelegentlich mit eingesetzten Testmaterialien, insbesondere Glas- oder bestimmten Plastikoberflächen, zu interagieren. So kann es zu einer materialabhängigen Adsorption des Wirkstoffes mit daraus resultierenden Konzentrationsschwankungen im Medium und falsch angezeigten MHK-Werten kommen (Fothergill et al., 2016; Uribe et al., 2022). Unter jenen Bedingungen ist die eindeutige Bestimmung eines MHK-Wertes schwierig und Caspofungin als Testwirkstoff für *C. auris* insgesamt kritisch zu sehen (Kordalewska et al., 2018). Daher kann nur angeraten werden *in vitro* Testungen eher mit Anidulafungin oder Micafungin durchzuführen. Konsequenterweise wurde die

EUCAST-konforme Mikrodilutionstestung im Verlauf dieser Arbeit auf Anidulafungin umgestellt.

Zur besseren Beurteilung der fungalen Zellvitalität wurde das von EUCAST vorgegebene Verfahren um Resazurin erweitert. Hierbei zeigten sich für die Testung mit/ohne Resazurin übereinstimmende Werte. Die ermittelten MHK-Werte der Anidulafungin-Mikrodilutionsplatten nach EUCAST waren meist mit den Ergebnissen des YO-Platten-Verfahrens vergleichbar. Für zwei Isolate mit bestätigter *FKSI*-Mutation (NRZ-2017-505-1 und NRZ-2017-505-2) konnten bei dem Mikrodilutionsverfahren nach EUCAST (32 und 64 µg/ml) MHK-Werte ermittelt werden, die deutlich höher lagen als die Ergebnisse der YO-Platten (1 und 2 µg/ml). Jene Isolate hoben sich innerhalb des YO-Platten Verfahren ebenso von den übrigen Isolaten ab und wiesen die höchsten detektierten MHK-Werte bei der Testung mit Anidulafungin auf. Weshalb die Mikrodilutionsplatten nach EUCAST im Vergleich stärker erhöhte Werte anzeigten, konnte nicht abschließend geklärt werden. Laut Literatur liegen auch für Anidulafungin Berichte über ein paradoxes Wachstumsverhalten vor. Jenes tritt für Anidulafungin jedoch deutlich seltener auf und konnte bisher nur in sehr schwacher Ausprägung via Spektrophotometer nachgewiesen werden (Kordalewska et al., 2018). So ist hier für die Mikrodilutionsplatten nach EUCAST eher nicht von einem sichtbaren paradoxen Wachstumsphänomen auszugehen.

Als letzte Testart wurde mit den E-Teststreifen ein ebenfalls CLSI M27-A2 konformes Verfahren gewählt (bioMérieux, 2013). Im Vergleich zu den YO-Platten lagen die abgelesenen MHK-Werte tendenziell höher, waren jedoch mit diesen vergleichbar. Zu beobachten war dies insbesondere bei den Amphotericin B-Platten. Für das Azol-Antimykotikum Voriconazol wichen einzelne Werte in den Verfahren teils voneinander ab. Dies ist möglicherweise auf einen im E-Test-Verfahren beobachteten Trailing-Effekt zurückzuführen, welcher die Auswertung erschwerte.

Zusammenfassend brachten die drei untersuchten Testverfahren vergleichbare Ergebnisse hervor. Abweichungen fanden sich bei der Testung von Caspofungin im Mikrodilutionsverfahren nach EUCAST und bei der Testung von Voriconazol im E-Test-Verfahren. Studien mit einer höheren Fallzahl an Isolaten könnten hierbei in Zukunft eine

zuverlässigere Einordnung bezüglich der Verbreitung von Resistenzen unter deutschen *C. auris* Fällen ermöglichen.

#### **4.3 Resistenzverhalten deutscher *C. auris* Isolate im Vergleich zu weltweit aufgetretenen Fällen**

Die gesammelten *C. auris* Isolate wurden auf vorhandene Resistenzen gegenüber Vertretern von 4 Antimykotika-Gruppen (Echinocandin-, Triazol-, Polyen-Antimykotika und Pyrimidin-Derivat) getestet. Für den Hefepilz *C. auris* wurden bisher weder durch das EUCAST noch durch das CLSI gültige klinische Breakpoints zur Bestimmung von Resistenzen festgelegt. Dies machte eine Einordnung bezüglich Resistenzausbildungen schwierig. Eine Möglichkeit zur Bewertung ermöglichen jedoch MHK-Werte, welche von den Centers of Disease Control and Prävention (CDC) veröffentlicht wurden. Hierbei handelt es sich um Orientierungshilfen, jedoch keine verbindlichen Werte, welche durch einen Vergleich mit nahe verwandten *Candida*-Spezies und Expertenmeinung ermittelt wurden (Centers for Disease Control and Prevention, 2020b). Als Grundlage zur weiteren Einschätzung auftretender Resistenzen wurden im Folgenden primär die ermittelten MHK-Werte des YO-Platten-Verfahren genutzt. Für dieses Verfahren lagen MHK-Werte zu allen untersuchten Isolaten und zu neun unterschiedlichen Wirkstoffen vor. Dies ermöglichte die beste Vergleichbarkeit innerhalb desselben Verfahrens.

Bei der Testung von Echinocandinen wiesen drei von zwölf Isolaten auffällige MHK-Werte im YO-Platten-Verfahren auf. Die CDC geben hier für mögliche Resistenzbildungen eine MHK von  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  für Anidulafungin,  $\geq 2 \mu\text{g/ml}$  für Caspofungin und  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  für Micafungin als klinische Breakpoints an. Folgt man diesen Vorgaben, ist das Isolat NRZ-2017-505-1 resistent gegenüber Micafungin (MHK:  $4 \mu\text{g/ml}$ ) und Caspofungin (MHK:  $2 \mu\text{g/ml}$ ) zu werten. Für Anidulafungin wäre das Isolat bei den YO-Platten trotz erhöhter MHK-Werte ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) als sensibel und bei den Mikrodilutionsplatten nach EUCAST (MW-MHK:  $32 \mu\text{g/ml}$ ) als resistent anzusehen. Das Isolat NRZ-2017-505-2 hingegen scheint resistent gegenüber den drei getesteten Echinocandinen (Anidulafungin MHK:  $4 \mu\text{g/ml}$ , Micafungin MHK:  $8 \mu\text{g/ml}$ , Caspofungin MHK:  $4 \mu\text{g/ml}$ ) zu sein. Beide Isolate zeigten eine *FKSI*-Mutation, so dass man von einer Resistenz gegenüber Echinocandinen und damit wohl auch von einer

Anidulafungin-Resistenz von NRZ-2017-505-1 ausgehen kann. So gilt das Vorhandensein einer *FKS*-Mutation auch bei anderen *Candida*-Spezies als Hinweis auf eine Resistenz gegenüber Echinocandinen, da Mutation und Resistenz bei der MHK-Testung fast immer korrelieren (Fraser et al., 2020; Lackner et al., 2014). So sind insgesamt zwei der zwölf untersuchten Isolate als resistent gegen alle getesteten Echinocandine anzusehen. Vergleicht man dies mit international gesammelten *C. auris* Isolaten, konnten für jene deutlich niedrigere Resistenzraten von 3,8 bis 7 % detektiert werden (Kordalewska et al., 2018; Lockhart et al., 2017). Jene Abweichung könnte auf die deutlich geringere Fallzahl der in dieser Arbeit untersuchten Fälle zurückzuführen sein. Des Weiteren war das Isolat NRZ-2015-214 auffällig. Das Isolat zeigte sich resistent gegenüber Caspofungin (MHK: >8 µg/ml), obwohl keine *FKS*-Mutation vorlag und auch keine Resistenz gegenüber den anderen Echinocandinen beobachtet werden konnte. Aus klinischen Angaben ist hier zudem bekannt, dass der Patient erfolgreich mit einem Echinocandin therapiert wurde (Hamprecht et al., 2019). In Zusammenschau aller Ergebnisse sollte die beobachtete Caspofunginresistenz somit eher isoliert betrachtet und von einer Sensitivität gegenüber Echinocandinen ausgegangen werden. Insgesamt waren somit 25 % aller Isolate im YO-Platten-Verfahren gegen Caspofungin resistent. Nach einer Metaanalyse von Chen et al. ist der Anteil weltweit gesammelter Caspofungin resistenter Isolate mit 12 % deutlich kleiner. Für indische Isolate konnten jedoch ebenso erhöhte Resistenzraten bei 23,6 % aller untersuchten Fälle nachgewiesen werden. Die beschriebenen Abweichungen sind wohl am ehesten auf die regional stark unterschiedliche Ausbildung von Resistenzen durch *C. auris* Wildtypen zurückzuführen (Chen et al., 2020). Jene Variationen im Resistenzverhalten unterstreichen die Notwendigkeit der Etablierung von zuverlässigen AFST zur Erstellung von resistogrammgerechten Behandlungen.

Weiterhin wurde das Resistenzverhalten der Isolate gegenüber dem Polyen-Antimykotikum Amphotericin B untersucht. Die CDC betrachten Isolate mit einer MHK von  $\geq 2$  µg/ml als resistent. Für das E-Test-Verfahren wird hingegen empfohlen, bereits MHK-Werte ab 1,5 µg/ml als Cut-Off zu werten (Centers for Disease Control and Prevention, 2020b). Folgt man diesen Kriterien, wären nach dem YO-Platten-Verfahren vier von zwölf Isolate als resistent zu werten (33,3 %), während nach dem E-Test-Verfahren alle Isolate als resistent zu betrachten wären. Vergleicht man dies mit dem

Anteil resistenter Isolate aus der Literatur (30 bis 35 %), so findet sich eher eine Übereinstimmung mit dem Ergebnis der YO-Platten (Lockhart et al., 2017; Centers for Disease Control and Prevention, 2020b). Aus diesem Grund sind die MHK-Vorgaben der CDC für das E-Test-Verfahren hier möglicherweise zu niedrig angesetzt. Zu bedenken ist hierbei, dass die Vorgaben der CDC wie bereits beschrieben nicht als allgemeingültige Cut-Off-Werte zu sehen sind. Betrachtet man den Grenzwert von 1,5 bis 2 µg/ml aus klinisch/therapeutischer Sicht erscheint dieser als hoch. Nach Fields et al. liegen die erreichten Serumspiegel unter einer Amphotericin B-Therapie im Tagesverlauf bei durchschnittlich 0,62 µg/ml bis 1,21 µg/ml (Fields et al., 1970). Damit stellt sich die Frage, ob bei der Behandlung einer *C. auris* Infektion Serumkonzentrationen von bis zu 2 µg/ml oder mehr über einen längeren Zeitraum erreicht werden können. In Anbetracht einer dosisabhängigen Toxizität erscheint Amphotericin B in diesem Zusammenhang als wenig empfehlenswerte Therapieoption (Laniado-Laborin und Cabrales-Vargas, 2009; Safdar et al., 2010). Dahingehend kann Amphotericin B bei den in Deutschland detektierten Isolaten gegenwärtig nur als Mittel der letzten Wahl oder lediglich in Kombinationstherapie empfohlen werden.

Für die untersuchten Azol-Antimykotika zeigte sich bei den YO-Platten ein variables Bild. Bis auf eine Ausnahme wiesen alle Isolate hohe MHK-Werte für Fluconazol (>64 µg/ml) auf. Die CDC geben hier eine MHK von 32 µg/ml als Cut-Off-Wert vor, sodass 92 % der untersuchten Isolate als resistent anzusehen wären. Fluconazol Resistenzen unter *C. auris* Isolaten sind keine Seltenheit und treten in der Literatur in 90 bis 93 % aller untersuchten Fälle auf (Centers for Disease Control and Prevention, 2020b; Lockhart et al., 2017). Die CDC geben keine MHK für Voriconazol vor. Von den hier getesteten Isolaten wiesen 16,7 % erhöhte MHK-Werte für Voriconazol auf ( $\geq 2$  µg/ml). Nach Lockhart et al. wären jene Isolate ( $\geq 2$  µg/ml) als resistent zu werten. Die in Deutschland untersuchten Isolate lagen damit unter der Resistenzrate weltweit gesammelter Proben (54 %) (Lockhart et al., 2017). Ein Vergleich zu *C. albicans* Wildtypen zeigt hier große Unterschiede. Für jene Spezies ist der Anteil an Voriconazol- und Fluconazol-Resistenzen mit jeweils 0,4 % deutlich geringer (Pfaller et al., 2013). Für alle anderen getesteten Azol-Antimykotika wurden keine Cut-Off-Werte durch die CDC definiert. Bezüglich der Wirkstoffe Itraconazol und Posaconazol konnten bei keinem untersuchten Isolat erhöhte MHK-Werte nachgewiesen werden. Dasselbe galt mit

Ausnahme des Isolates (NRZ-2017-505-3, MHK: 16 µg/ml) auch für 5-Flucytosin. Nach Eyre et al. konnten bei Isolaten aus dem Vereinigten Königreich ebenso keine Resistenzen gegenüber 5-Flucytosin detektiert werden (Eyre et al., 2018). Weitere Forschung erscheint hier angebracht. Möglicherweise stellen Itraconazol oder Posaconazol eine wirksame Behandlungsoption bei multiresistenten Wildtypen dar. 5-Flucytosin ist wegen seines ausgeprägten dosisabhängigen Nebenwirkungsspektrums und aufgrund einer rascher Resistenzbildung in Monotherapie wohl eher nicht als alleinige Behandlungsoption zu empfehlen (Vermes et al., 2000).

Interessanterweise konnte bei Patient 6, von welchem das Isolat NRZ-2017-505-1 und dessen Folgeisolate NRZ-2017-505-2 und -3 gewonnen wurden, ein tendenzieller Anstieg der MHK-Werte für Amphotericin B und Voriconazol von Erst- zu Letztisolat beobachtet werden. Der Patient wurde zuvor 6 Monate lang erfolglos mit eben jenen Antimykotika behandelt. Für das Isolat NRZ-2017-505-3 lag hier im Gegensatz zu seinen Vorisolaten eine Resistenz gegen Amphotericin B im YO-Platten-Verfahren vor. Nach Lockhart et al. wäre das Isolat NRZ-2017-505-3 außerdem als resistent gegen Voriconazol zu werten (Lockhart et al., 2017). Zudem wies jenes Isolat als einziges unter allen getesteten Isolaten eine erhöhte MHK gegen 5-Flucytosin auf. Für die Isolate NRZ-2017-505-1 und NRZ-2017-505-2 hingegen konnten Resistenzen gegen Echinocandine und zugleich Mutationen im *FKSI*-Hot Spot 1 beobachtet werden (S639Y und S639F). Mutationen im *FKSI*-Gen stehen mit Echinocandin-Resistenzen in Zusammenhang (Chow et al., 2020). NRZ-2017-505-3 hingegen zeigte keine Mutation in *FKSI* und erwies sich zudem sensitiv gegenüber Echinocandinen in der YO-Platten-Testreihe. Die Isolate wichen außerdem in Bezug auf die detektierten Mutationen im *ERG11*-Gen ab (NRZ-2017-505-1 und NRZ-2017-505-2: Mutation vom Typ K143R, NRZ-2017-505-3: Mutation vom Typ Y132F). In Zusammenschau des unterschiedlichen Resistenzverhaltens und der Abweichung im *ERG11*- und *FKSI*-Gen erscheint eine Mehrfachbesiedlung wahrscheinlich. Patient Nr. 6, von welchem die Isolate gewonnen wurden, wurde aufgrund einer abdominalen Schusswunde behandelt. Eine durch ein Trauma bedingte erleichterte Überwindung von Immunbarrieren oder eine durch eine Verletzung der Verdauungsorgane induzierte Ausbreitung der Hefepilze erscheinen nicht abwegig, da der GI-Trakt laut Literatur als natürlicher Lebensraum von *Candida* Spezies dient (Schulze und Sonnenborn, 2009). Aufgrund der eingeleiteten Therapie könnte das Isolat

NRZ-2017-505-3, welches sich in den AFST resistent gegenüber den eingesetzten Antimykotika zeigte, im Anschluss selektiert worden sein. Weiterhin war auffällig, dass das Erstisolat NRZ-2017-505-1 aus positiv bebrüteten Blutkulturen isoliert wurde, während die Folgeisolate nur in Urinproben nachgewiesen werden konnten. Nach Soll et al. wurde beobachtet, dass Hefepilze durch eine antimykotische Therapie in Blutproben initial nicht mehr nachweisbar waren. In manchen Fällen konnten Infektionen mit demselben Keim jedoch trotz erfolgter Elimination an einer anderen Lokalisation wieder aufflammen (Soll et al., 1988). Dies könnte das Auftreten von NRZ-2017-505-2 in Urinkulturen trotz einer bereits eingeleiteten Therapie erklären.

Für die Isolate NRZ-2017-394/1-5 konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Während die Isolate NRZ-2017-394-1 und NRZ-2017-394-2 zunächst im Urin nachweisbar waren, wurden die Folgeisolate im Anschluss in Haut-, Nasen- und Tracheostomaabstrichen nachgewiesen. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Fall lag bei den Isolaten der NRZ-2017-394-Reihe jedoch ein ähnliches Resistenzverhalten vor. Lediglich bezüglich der Amphotericin B Resistenz konnten Unterschiede im YO-Plattenverfahren beobachtet werden, welche sich allerdings nicht im E-Testverfahren zeigten. Zudem wiesen alle Isolate denselben Mutationstyp Y132F im *ERG11*-Gen auf. Eine Zweitbesiedlung scheint hier eher unwahrscheinlich. Im Gegensatz zu den Isolaten der NRZ-2017-505-Reihe lag hier bei fehlender antimykotischer Therapie auch kein zusätzlicher Selektionsfaktor vor.

#### **4.4 Bewertung der genetischen Untersuchung**

Bei den angewandten molekulargenetischen Methoden (PCR, Sanger-Sequenzierung und Analyse von Hot Spot Regionen auf Mutationen) handelt es sich um schnell durchzuführende Verfahren ohne große Fehleranfälligkeit. Um das vorliegende Resistenzverhalten von *C. auris* genauer zu analysieren, bedarf es weiterer molekulargenetischer Forschung. So wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, in welcher Höhe von Mutationen betroffene Genabschnitte tatsächlich amplifiziert wurden. Ebenso wurde kein Screening bezüglich vorhandener Kopienzahlvarianten (CNV) einzelner Genabschnitte durchgeführt. In beiden Fällen erscheint zum Beispiel eine Untersuchung mittels Real-Time-quantitative-PCR (qPCR) als vielversprechender Ansatz (Rybak et al.,

2020). So konnten Chow et al. für *ERG11*-Mutationen zeigen, dass bei *C. auris* Isolaten mit bestimmten Kopienzahlvarianten auch höhere MHK-Werte zu erwarten sind (Chow et al., 2020).

#### 4.5 Beurteilung der festgestellten Mutationen in Resistenzgenen

Bei der Analyse des *FKSI*-Hot Spot 1 der *C. auris* Isolate wurden lediglich bei NRZ-2017-505-1 und -2 Mutationen entdeckt. Es handelte sich hierbei um Mutationen des Typs S639Y (NRZ-2017-505-1) beziehungsweise S639F (NRZ-2017-505-2). Beide Isolate wiesen in den AFST erhöhte MHK-Werte für Echinocandine auf, sodass man davon ausgehen kann, dass die detektierten Mutationen in Zusammenhang mit einer Resistenzbildung stehen. Eine zentrale Bedeutung scheint hier der Austausch von Serin an Position 639 des Fks1-Proteins zu haben. So sind mittlerweile drei S639-Polymorphismen (S639Y, S639F und S639P) für *C. auris* bekannt, welche laut Literatur mit einer Resistenzausbildung gegen Echinocandine auftreten (Chow et al., 2020; Woodworth et al., 2019; Chaabane et al., 2019; Hou et al., 2019; Biagi et al., 2019). Auch bei Mutationen in orthologen Positionen anderer *Candida*-Spezies kommt es, meist in Verbindung mit einer Serin-Substitution, zur Ausbildung von Echinocandin-Resistenzen. So zum Beispiel im Falle einer S645P-Mutation im *FKSI*-Gen bei *C. albicans*, beziehungsweise *C. glabrata*. Des Weiteren im Falle einer S645F-Mutation bei *C. albicans* (Arendrup et al., 2009; Laverdiere et al., 2006; Castanheira et al., 2010). Die Mutationstypen S639F und S639Y treten laut Literatur am häufigsten bei *C. auris* Vertretern von Clade I und III auf. Beide in dieser Arbeit detektierten Mutationen fanden sich bei Vertretern aus Clade I. Die Variante S639P hingegen stellt laut Literatur den häufigsten Typ dar, konnte bei den vorliegenden Isolaten jedoch nicht beobachtet werden (Chow et al., 2020). Für das Isolat NRZ-2015-214 konnte trotz festgestellter Caspofungin-Resistenz in den AFST keine Mutation in der *FKS*-Region festgestellt werden. Möglicherweise ist ein anderer Mechanismus an der Bildung von Resistenzen beteiligt, oder es ist von einer Sensitivität auszugehen. Mutationen in der *FKSI*-Hot Spot 2-Region konnten in dieser Arbeit bei keinem Isolat nachgewiesen werden.

Bezüglich der Untersuchung der *ERG11*-Genregion konnten insgesamt drei Mutationstypen (K143R, Y132F und F126L) detektiert werden. Hierbei konnte der



Mutationstyp Y132F mit 66,7 % am häufigsten beobachtet werden. Bei 25 % der Isolate fand sich der Typ K143R und lediglich in einem Fall F126L (8,3 %). Ein Zusammenhang zwischen *ERG11*-Mutationen und der Ausbildung von Triazolresistenzen bei *C. auris* Isolaten wurde mittlerweile in mehreren Studien nachgewiesen (Lockhart et al., 2017; Chowdhary et al., 2018). Weshalb das Isolat NRZ-2017-394-2 trotz nachweisbarer Mutation im *ERG11*-Gen keine Resistenz gegen Fluconazol in den AFST aufwies, konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise handelte es sich um eine singuläre Fehlmessung durch das YO-Platten-Verfahren. Eine Testung durch ein anderes Testverfahren, wie beispielsweise durch E-Teststreifen, könnte hier Aufschluss geben. Einzelne Isolate wiesen zudem hohe MHK-Werte für Voriconazol auf. Nach Ahmad et al. gibt es Hinweise darauf, dass eine K143R-Mutation im Erg11-Protein mit einer Resistenzausbildung gegen Voriconazol einhergeht (Ahmad et al., 2020). Dieser Zusammenhang konnte hier nur bedingt beobachtet werden. Für jene Isolate, die eine Mutation vom Typ K143R aufwiesen, konnten in den AFST zwar erhöhte MHK-Werte gegenüber Voriconazol ermittelt werden, allerdings lagen diese ausnahmslos unter dem von den CDC festgelegten Cut-Off-Wert von  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$ . Diejenigen Isolate, die in dieser Arbeit nach den CDC-Vorgaben als resistent gewertet wurden, wiesen hingegen allesamt eine Mutation des Typen Y132F oder F126L auf. Insgesamt betrachtet erscheint in Zukunft die Untersuchung anderer Azol-Resistenzmechanismen lohnend. So konnten Studien zeigen, dass Mutationen von TAC1p als Transkriptionsfaktor der ABC-Transporter Gene *CDR1* und *CDR2*, wie auch Mutationen im *MDR1*-Gen, welche zu einer gesteigerten Expression der Multidrug-Efflux-Pumpe führen können, einen erheblichen Einfluss auf die Ausbildung von Triazol-Resistenzen bei *C. albicans* haben können (Coste et al., 2006; Dunkel et al., 2008). Bei den meisten Isolaten konnte eine Sensitivität gegenüber 5-Flucytosin detektiert werden. Vielversprechend könnte hier eine Untersuchung auf Mutationen im Uracil-Phosphoribosyltransferase (*FURI*)-Gen sein. Laut aktuellen Studien wurde jene Mutation bei 5-Flucytosin-resistenten *C. albicans* und *C. lusitanae* Isolaten beobachtet (Dodgson et al., 2004; Papon et al., 2007; Rhodes et al., 2018).

Amphotericin B-resistente Isolate wurden in dieser Arbeit nicht molekulargenetisch untersucht. Für jenen Wirkstoff sind die an der Ausbildung von Resistenzen beteiligten Gene nur wenig erforscht. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass Genregionen wie

beispielsweise *ERG2* oder *ERG6*, die am Ergosterol-Synthese-Pathway von *Candida*-Spezies beteiligt sind, hier eine Rolle spielen (Hull et al., 2012; Vandeputte et al., 2008). Ebenso konnten für *C. albicans* Isolate mit gleichzeitig vorliegenden Mutationen im *ERG11*- und *ERG5*-Gen neben vorhandenen Azol-Resistenzen auch ein verringertes Ansprechen auf Amphotericin B festgestellt werden (Martel et al., 2010). Auch hier bedarf es in Zukunft weiterer molekulargenetischer Forschung zur Identifikation von *C. auris* Resistenzmechanismen.

#### **4.6 Geographische Herkunft der in Deutschland gewonnenen Isolate**

Aus phylogenetischer Sicht konnten alle hier untersuchten Isolate bis auf eine Ausnahme Clade I zugeordnet werden (91,7 %). Die größte genetische Verwandtschaft dieser Isolate bestand hierbei zu Referenzstämmen aus Indien und Pakistan. Ein Isolat (NRZ-2017-545) konnte dem südafrikanischen Clade III zugeordnet werden. Vergleicht man hiermit die Verteilung international gesammelter Isolate nach Chow et al., so erwies sich Clade I ebenso als der am häufigsten vorkommende Clade (41 %). Clade III stellte mit 17 % aller Isolate den dritthäufigsten Typus (17 %) dar (Chow et al., 2020). Isolate aus Clade I weisen zudem laut Literatur den höchsten Anteil an Fluconazol- und Amphotericin B-Resistenzen auf (Lockhart et al., 2017; Chow et al., 2020). Dies ist gut vereinbar mit der hohen Zahl an resistenten Keimen, die in dieser Arbeit detektiert und Clade I zugeordnet wurden. Unterschiede konnten ebenso bezüglich vorliegender Mutationen in Resistenzgenen festgestellt werden. Wie ebenfalls bei Chow et al. beschrieben wurden in dieser Arbeit Mutationen vom Typ Y132F und K143R im FKS1-Hot Spot bei Vertretern aus Clade I nachgewiesen (Chow et al., 2020). Das Isolat NRZ-2017-545, welches Clade III zugeordnet werden konnte, wies hingegen eine Mutation vom Typ F126L auf. Dies deckt sich mit Berichten aus der Literatur, da jene Mutation bisher ausschließlich bei Vertretern von Clade III zu finden war (Chow et al., 2020).

#### **4.7 Bedeutung von *C. auris* für deutsches Infektionsgeschehen**

Mit einer Fallzahl von insgesamt sieben Fällen im Zeitraum von 2015 bis 2017 ist der Anteil von *C. auris* Isolaten an der Gesamtzahl in Deutschland auftretender Candidosen sehr gering. Lediglich in zwei Fällen konnte der Keim hierbei in Blutkulturen

nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu kommt es im europäischen Mittel zu 9 Candidämien pro 1000 (chirurgisch-) intensivmedizinischer Aufnahmen durch diverse Candida-Spezies (Klingspor et al., 2015). Nichtsdestotrotz sollte *C. auris* als Pathogen nicht unterschätzt werden. Obwohl eine Auftrennung der *C. auris* Clades bereits vor etwa 400 Jahren stattfand, konnte der Hefepilz erst 2009 identifiziert werden und bis dahin das Gesundheitssystem vieler Länder nahezu unbemerkt unterwandern (Chow et al., 2020; Satho et al., 2009; Chowdhary et al., 2013). Blickt man auf das epidemiologische Geschehen in Indien ist der dortige Anteil von *C. auris* Isolaten an der Gesamtzahl aller dokumentierten ICU assoziierten Candidämien mit 5,2 % deutlich höher. Bedrohlich erscheint ebenso das kürzliche ausbruchartige Auftreten in westlichen Gesundheitseinrichtungen (Chakrabarti et al., 2015; Adams et al., 2018; Schelenz et al., 2016). Aktuell häufen sich zudem Berichte aus zahlreichen Ländern (Libanon, Brasilien, USA und Mexiko), in denen es zu einem erhöhten Aufkommen von *C. auris* Infektionen bei Patienten kam, welche aufgrund einer Covid-19-Infektion intensivpflichtig wurden (Allaw et al., 2021; de Almeida et al., 2021; Prestel et al., 2021; Villanueva-Lozano et al., 2021). Dies zeigt umso mehr, dass es von großer Bedeutung ist die Pathogenitätsmechanismen des Hefepilzes zu verstehen. So kann nur empfohlen werden potenzielle *C. auris* Fälle inklusive vorliegender Resistenzen korrekt zu identifizieren und an zentrale Meldestellen wie das NRZMyk weiterzuleiten. Ein weiteres Ziel sollte, insbesondere im Hinblick auf hohe Resistenzraten, die Erforschung geeigneter Therapiemöglichkeiten sein. So erscheint zum Beispiel der Wirkstoff Ibrexafungerp, welcher mit der 1-3- $\beta$ -D-Glucan Synthase interagiert, in aktuellen Studien als vielversprechender Therapieansatz. Der Wirkstoff konnte selbst bei Echinocandin-resistenten Isolaten mit vorhandener *FKSI*-Mutation eine antifungale Wirkung entfalten (Arendrup et al., 2020; Nunnally et al., 2019). Nach Singh et al. erscheint auch die Kombination einer antimykotischen Therapie mit dem für *C. albicans* entwickelten Impfstoff NDV-3A vielversprechend. Durch die Ausbildung von Kreuzreaktionen konnte hierbei eine Immunität gegen *C. auris* getriggert und im Tierversuch die Mortalität einer Infektion gesenkt werden (Singh et al., 2019).

## 5. Zusammenfassung

Bei dem 2009 erstbeschriebenen Hefepilz *C. auris* handelt es sich um einen Keim, welcher aufgrund von nosokomialen Ausbrüchen und hohen Antimykotikaresistenzen Aufmerksamkeit erregte. Ziel dieser Arbeit war es in Deutschland gesammelte Isolate bezüglich vorhandener Resistenzen und Mutationen in Resistenzregionen zu testen und das epidemiologische Geschehen hierzulande mit dem globalen Auftreten des Keims zu vergleichen. Bezüglich der durchgeführten Resistenztestungen wiesen die CLSI-konformen Testarten (YO-Platten und E-Test-Verfahren) meist vergleichbare Ergebnisse auf. Für das EUCAST-konforme Mikrodilutionstestverfahren kann aufgrund eines stark ausgeprägten paradoxen Wachstumseffekts nur Anidulafungin, nicht jedoch Caspofungin, zur Testung empfohlen werden. Insgesamt erwiesen sich 25 % der Isolate als Caspofungin-resistent. Zwei Isolate zeigten eine Resistenz gegenüber allen getesteten Echinocandinen (16,7 %). Die höchsten Resistenzraten wurden gegenüber Fluconazol (92 %) beobachtet. Zwei der Isolate zeigten sich gegenüber Voriconazol resistent (16,7 %). Für Amphotericin B konnte eine Resistenzrate von 33,3 % festgestellt werden. Für die Wirkstoffe Posaconazol und Itraconazol erwiesen sich alle untersuchten Isolate als sensitiv. Dies konnte auch mit Ausnahme eines Isolates für 5-Flucytosin beobachtet werden. Die durch eine Sanger-Sequenzierung erhaltenen Sequenzen der Gene *FKSI* und *ERG11* wurden auf Mutationen untersucht, welche zu Aminosäuresubstitutionen im Gesamtprotein führten. Hierbei ergaben sich für zwei Isolate (16,7 %) Mutationen im *FKSI*-Hot Spot 1 (Typ S639F und S639Y). Beide Isolate zeigten sich in den AFST Echinocandin-resistent. Bei allen untersuchten Isolaten lagen Mutationen im *ERG11* Gen vor. So fand sich in 8 Fällen eine Mutation des Typen Y132F (66,7 %), in 3 Fällen der Typ K143R (25 %) und in einem Fall der Typ F126L (8,3 %). Im Rahmen eines anderen Projekts wurde mit den hier gewonnenen PCR-Produkten ein WGS durchgeführt, um die Isolate durch SNPs-Vergleich mit Referenzstämmen phylogenetischen Clades zuzuordnen. Dabei konnten 91,7 % der Isolate dem südasiatischen Clade I und ein Isolat dem südafrikanischen Clade III zugeordnet werden. Aufgrund der geringen epidemiologischen Fallzahlen in Deutschland scheint gegenwärtig keine Bedrohung von *C. auris* auszugehen. Berichte aus anderen Ländern konnten allerdings eine rasche, ausbruchartige Zunahme von *C. auris* Fällen nachweisen. So kann nur angeraten werden das infektiologische Geschehen in Deutschland weiterhin zu beobachten.

## Summary

The fungus *C. auris* was first described in the year 2009. Because of a high number of nosocomial outbreaks and high antimycotic resistance rates the fungus attracted great media attention. The aim of this dissertation was to test German isolates for antimycotic resistance and mutations in resistance genes. Additionally, the epidemiological occurrence in Germany was compared to the global outspread. In this context CLSI-conform methods for resistance testing (YO-Plates and E-Test-Plates) generated comparable results. The testing of EUCAST-conform microdilution plates showed a strong paradoxical growth for Caspofungin. Because of this only Anidulafungin can be recommended for testing. In summary 25 % of the isolates were resistant against Caspofungin. Two isolates showed resistance against all tested Echinocandines (16,7 %). The highest rates were detected for Fluconazol (92 %). Furthermore, two of the isolates (16,7 %) showed resistance against Voriconazol. There was a resistance rate of 33,3 % to Amphotericin B. No isolate showed resistance against Posaconazol or Itraconazol. And only one isolate was resistant against 5-Flucytosin. Sanger-Sequencing was used to detect mutations in resistance genes *FKSI* und *ERG11*, which could lead to a substitution of amino acids in the protein. There were two isolates (16,7 %) with mutations in *FKSI*-Hot Spot I (type S639F and S639Y). Both isolates showed a Echinocandin resistance in AFST. All tested isolates showed a mutation in *ERG11*. There were eight cases of type Y132F (66,7 %), three cases of K143R (25 %) and in one case type F126L (8,3 %). The PCR products of this study were used in a different project for WSG. This made it possible to group the isolates into phylogenetic clades. In summary 91,7 % of the isolates were related to Clade I (South Asia) and one isolate was related to Clade III (South Africa). Because of low epidemiologic occurrence in Germany, there is little threat of severe health care issues at the moment. Reports from different countries all over the world however, showed a quick, outbreak-like increase of *C. auris* cases. Therefore, further observation of German epidemiology is highly recommended.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adams, E., Quinn, M., Tsay, S., Poirot, E., Chaturvedi, S., Southwick, K., Greenko, J., Fernandez, R., Kallen, A., Vallabhaneni, S., Haley, V., Hutton, B., Blog, D., Lutterloh, E., Zucker, H., & Candida auris Investigation, W. (2018). Candida auris in Healthcare Facilities, New York, USA, 2013-2017. *Emerg Infect Dis*, 24(10), 1816-1824. <https://doi.org/10.3201/eid2410.180649>
- Ahmad, S., Khan, Z., Al-Sweih, N., Alfouzan, W., & Joseph, L. (2020). Candida auris in various hospitals across Kuwait and their susceptibility and molecular basis of resistance to antifungal drugs. *Mycoses*, 63(1), 104-112. <https://doi.org/10.1111/myc.13022>
- Alastruey-Izquierdo, A., Melhem, M. S., Bonfietti, L. X., & Rodriguez-Tudela, J. L. (2015). SUSCEPTIBILITY TEST FOR FUNGI: CLINICAL AND LABORATORIAL CORRELATIONS IN MEDICAL MYCOLOGY. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 57 Suppl 19(Suppl 19), 57-64. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700011>
- Aldejohann, A. M., Herz, M., Martin, R., Walther, G., & Kurzai, O. (2021). Emergence of resistant Candida glabrata in Germany. *JAC Antimicrob Resist*, 3(3), dlab122. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab122>
- Alexander, B. D., Johnson, M. D., Pfeiffer, C. D., Jiménez-Ortigosa, C., Catania, J., Booker, R., Castanheira, M., Messer, S. A., Perlin, D. S., & Pfaller, M. A. (2013). Increasing echinocandin resistance in Candida glabrata: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(12), 1724-1732. <https://doi.org/10.1093/cid/cit136>
- Allaw, F., Kara Zahreddine, N., Ibrahim, A., Tannous, J., Taleb, H., Bizri, A. R., Dbaibo, G., & Kanj, S. S. (2021). First Candida auris Outbreak during a COVID-19 Pandemic in a Tertiary-Care Center in Lebanon. *Pathogens*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens10020157>
- Andstrom, E. E., Ringden, O., Remberger, M., Svahn, B. M., & Tollemar, J. (1996). Safety and efficacy of liposomal amphotericin B in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Mycoses*, 39(5-6), 185-193. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1996.tb00123.x>
- Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J. and The Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2017). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts - EUCAST E.DEF 7.3.1. 2017:1-21. von <http://www.EUCAST.org> (letzter Zugriff 07.2018)
- Arendrup, M. C., Garcia-Effron, G., Buzina, W., Mortensen, K. L., Reiter, N., Lundin, C., Jensen, H. E., Lass-Flörl, C., Perlin, D. S., & Bruun, B. (2009). Breakthrough Aspergillus fumigatus and Candida albicans double infection during caspofungin treatment: laboratory characteristics and implication for susceptibility testing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(3), 1185-1193. <https://doi.org/10.1128/AAC.01292-08>
- Arendrup, M. C., Jørgensen, K. M., Hare, R. K., & Chowdhary, A. (2020). *In Vitro* Activity of Ibrexafungerp (SCY-078) against Candida auris Isolates as

- Determined by EUCAST Methodology and Comparison with Activity against *C. albicans* and *C. glabrata* and with the Activities of Six Comparator Agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(3), e02136-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02136-19>
- Beyda, N. D., Lewis, R. E., & Garey, K. W. (2012). Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Ann Pharmacother*, 46(7-8), 1086-1096. <https://doi.org/10.1345/aph.1R020>
- Biagi, M. J., Wiederhold, N. P., Gibas, C., Wickes, B. L., Lozano, V., Bleasdale, S. C., & Danziger, L. (2019). Development of High-Level Echinocandin Resistance in a Patient With Recurrent *Candida auris* Candidemia Secondary to Chronic Candiduria. *Open Forum Infect Dis*, 6(7), ofz262. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz262>
- bioMérieux. (2013). EN ETEST®: Antifungal Susceptibility Testing, 9305056D - en 2013/02. von [https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package\\_Insert/35904001-35905000/Package\\_Insert\\_-\\_D\\_-\\_en\\_-\\_Etest\\_-\\_AFST\\_WW.pdf](https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/35904001-35905000/Package_Insert_-_D_-_en_-_Etest_-_AFST_WW.pdf) (letzter Zugriff am 29.03.2021)
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*, 4(165), 165rv113. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>
- Cadnum, J. L., Shaikh, A. A., Piedrahita, C. T., Sankar, T., Jencson, A. L., Larkin, E. L., Ghannoum, M. A., & Donskey, C. J. (2017). Effectiveness of Disinfectants Against *Candida auris* and Other *Candida* Species. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 38(10), 1240-1243. <https://doi.org/10.1017/icc.2017.162>
- Calvo, B., Melo, A. S., Perozo-Mena, A., Hernandez, M., Francisco, E. C., Hagen, F., Meis, J. F., & Colombo, A. L. (2016). First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *J Infect*, 73(4), 369-374. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.07.008>
- Castanheira, M., Woosley, L. N., Diekema, D. J., Messer, S. A., Jones, R. N., & Pfaller, M. A. (2010). Low prevalence of fks1 hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(6), 2655-2659. <https://doi.org/10.1128/AAC.01711-09>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020a). Identification of *Candida auris*. Tabelle: Identification method. von <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/identification.html#identify> (letzter Zugriff am 15.06.2021)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020b). *Candida auris*: Antifungal Susceptibility Testing and Interpretation. von <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html> (letzter Zugriff am 29.03.2021)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021). Excel-Dokument: countries-with-cases-12-of-february-2021 (2). Fallzahl vom 12.02.2021. von <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html#recent> (letzter Zugriff am 10.06.2021)
- Chaabane, F., Graf, A., Jequier, L., & Coste, A. T. (2019). Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. *Frontiers in microbiology*, 10, 2788. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02788>
- Chakrabarti, A., Sood, P., Rudramurthy, S. M., Chen, S., Kaur, H., Capoor, M., Chhina, D., Rao, R., Eshwara, V. K., Xess, I., Kindo, A. J., Umabala, P., Savio, J., Patel, A., Ray, U., Mohan, S., Iyer, R., Chander, J., Arora, A., Sardana, R., Roy, I.,

- Appalaraju, B., Sharma, A., Shetty, A., Khanna, N., Marak, R., Biswas, S., Das, S., Harish, B. N., Joshi, S., & Mendiratta, D. (2015). Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med*, *41*(2), 285-295. <https://doi.org/10.1007/s00134-014-3603-2>
- Chatterjee, P., Choi, H., Ochoa, B., Garmon, G., Coppin, J. D., Allton, Y., Lukey, J., Williams, M. D., Navarathna, D., & Jinadatha, C. (2020). Clade-specific variation in susceptibility of *Candida auris* to broad-spectrum ultraviolet C light (UV-C). *Infect Control Hosp Epidemiol*, *41*(12), 1384-1387. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.410>
- Chen, J., Tian, S., Han, X., Chu, Y., Wang, Q., Zhou, B., & Shang, H. (2020). Is the superbug fungus really so scary? A systematic review and meta-analysis of global epidemiology and mortality of *Candida auris*. *BMC Infect Dis*, *20*(1), 827. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05543-0>
- Chow, N. A., de Groot, T., Badali, H., Abastabar, M., Chiller, T. M., & Meis, J. F. (2019). Potential Fifth Clade of *Candida auris*, Iran, 2018. *Emerg Infect Dis*, *25*(9), 1780-1781. <https://doi.org/10.3201/eid2509.190686>
- Chow, N. A., Gade, L., Tsay, S. V., Forsberg, K., Greenko, J. A., Southwick, K. L., Barrett, P. M., Kerins, J. L., Lockhart, S. R., Chiller, T. M., Litvintseva, A. P., & Team, U. S. C. a. I. (2018). Multiple introductions and subsequent transmission of multidrug-resistant *Candida auris* in the USA: a molecular epidemiological survey. *Lancet Infect Dis*, *18*(12), 1377-1384. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30597-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30597-8)
- Chow, N. A., Muñoz, J. F., Gade, L., Berkow, E. L., Li, X., Welsh, R. M., Forsberg, K., Lockhart, S. R., Adam, R., Alanio, A., Alastruey-Izquierdo, A., Althawadi, S., Araúz, A. B., Ben-Ami, R., Bharat, A., Calvo, B., Desnos-Ollivier, M., Escandón, P., Gardam, D., Gunturu, R., Heath, C. H., Kurzai, O., Martin, R., Litvintseva, A. P., & Cuomo, C. A. (2020). Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of *Candida auris* Using Population Genomic Analyses. *mBio*, *11*(2), e03364-03319. <https://doi.org/10.1128/mBio.03364-19>
- Chowdhary, A., Prakash, A., Sharma, C., Kordalewska, M., Kumar, A., Sarma, S., Tarai, B., Singh, A., Upadhyaya, G., Upadhyay, S., Yadav, P., Singh, P. K., Khillan, V., Sachdeva, N., Perlin, D. S., & Meis, J. F. (2018). A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009-17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *J Antimicrob Chemother*, *73*(4), 891-899. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx480>
- Chowdhary, A., Sharma, C., Duggal, S., Agarwal, K., Prakash, A., Singh, P. K., Jain, S., Kathuria, S., Randhawa, H. S., Hagen, F., & Meis, J. F. (2013). New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. *Emerg Infect Dis*, *19*(10), 1670-1673. <https://doi.org/10.3201/eid1910.130393>
- CLSI. (2017). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cortés, J. A., Corrales, I. F. (2018). Invasive Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors, Fungal Infection, Érico Silva de Loreto and Juliana Simoni Moraes Tondolo, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.81813. von



- <https://www.intechopen.com/books/fungal-infection/invasive-candidiasis-epidemiology-and-risk-factors> (letzter Zugriff am 29.06.2021)
- Coste, A., Turner, V., Ischer, F., Morschhauser, J., Forche, A., Selmecki, A., Berman, J., Bille, J., & Sanglard, D. (2006). A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics*, 172(4), 2139-2156. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.054767>
- de Almeida, J. N., Jr., Assy, J. G., Levin, A. S., Del Negro, G. M., Giudice, M. C., Tringoni, M. P., Thomaz, D. Y., Motta, A. L., Abdala, E., Pierrotti, L. C., Strabelli, T., Munhoz, A. L., Rossi, F., & Benard, G. (2016). *Candida haemulonii* Complex Species, Brazil, January 2010-March 2015. *Emerg Infect Dis*, 22(3), 561-563. <https://doi.org/10.3201/eid2203.151610>
- de Almeida, J. N., Jr., Francisco, E. C., Hagen, F., Brandao, I. B., Pereira, F. M., Presta Dias, P. H., de Miranda Costa, M. M., de Souza Jordao, R. T., de Groot, T., & Colombo, A. L. (2021). Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. *J Fungi (Basel)*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/jof7030220>
- Diasio, R. B., Bennett, J. E., & Myers, C. E. (1978). Mode of action of 5-fluorocytosine. *Biochemical pharmacology*, 27(5), 703-707. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(78\)90507-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(78)90507-5)
- Dodgson, A. R., Dodgson, K. J., Pujol, C., Pfaller, M. A., & Soll, D. R. (2004). Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the FUR1 gene of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(6), 2223-2227. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2223-2227.2004>
- Douglas, C. M., D'Ippolito, J. A., Shei, G. J., Meinz, M., Onishi, J., Marrinan, J. A., Li, W., Abruzzo, G. K., Flattery, A., Bartizal, K., Mitchell, A., & Kurtz, M. B. (1997). Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(11), 2471-2479. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.11.2471>
- Du, H., Bing, J., Hu, T., Ennis, C. L., Nobile, C. J., & Huang, G. (2020). *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog*, 16(10), e1008921. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008921>
- Dunkel, N., Blass, J., Rogers, P. D., & Morschhauser, J. (2008). Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol*, 69(4), 827-840. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06309.x>
- Ellis D. (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 49 Suppl 1, 7-10. [https://doi.org/10.1093/jac/49.suppl\\_1.7](https://doi.org/10.1093/jac/49.suppl_1.7)
- Eyre, D. W., Sheppard, A. E., Madder, H., Moir, I., Moroney, R., Quan, T. P., Griffiths, D., George, S., Butcher, L., Morgan, M., Newnham, R., Sunderland, M., Clarke, T., Foster, D., Hoffman, P., Borman, A. M., Johnson, E. M., Moore, G., Brown, C. S., Walker, A. S., Peto, T. E. A., Crook, D. W., & Jeffery, K. J. M. (2018). A *Candida auris* Outbreak and Its Control in an Intensive Care Setting. *N Engl J Med*, 379(14), 1322-1331. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1714373>
- Falagas, M. E., Roussos, N., & Vardakas, K. Z. (2010). Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis*, 14(11), e954-966. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.04.006>

- Feigal, D. W., Katz, M. H., Greenspan, D., Westenhouse, J., Winkelstein, W., Jr., Lang, W., Samuel, M., Buchbinder, S. P., Hessol, N. A., Lifson, A. R., & et al. (1991). The prevalence of oral lesions in HIV-infected homosexual and bisexual men: three San Francisco epidemiological cohorts. *AIDS*, 5(5), 519-525. <https://doi.org/10.1097/00002030-199105000-00007>
- Fidel, P. L., Jr, Vazquez, J. A., & Sobel, J. D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 80-96. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.80>
- Fields, B. T., Jr, Bates, J. H., & Abernathy, R. S. (1970). Amphotericin B serum concentrations during therapy. *Applied microbiology*, 19(6), 955-959. <https://doi.org/10.1128/am.19.6.955-959.1970>
- Finkelstein A. (1973) Aqueous pores created in thin lipid membranes by the antibiotics nystatin, amphotericin B and gramicidin A: implications for pores in plasma membranes. In: Callingham B.A. (eds) *Drugs and Transport Processes*. Biological Council (The Coordinating Committee for Symposia on Drug Action). Palgrave, London. [https://doi.org/10.1007/978-1-349-02273-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-349-02273-1_14)
- Fothergill, A. W., McCarthy, D. I., Albatineh, M. T., Sanders, C., McElmeel, M., & Wiederhold, N. P. (2016). Effects of Treated versus Untreated Polystyrene on Caspofungin In Vitro Activity against *Candida* Species. *J Clin Microbiol*, 54(3), 734-738. <https://doi.org/10.1128/JCM.02659-15>
- Francis, P., & Walsh, T. J. (1992). Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy. *Clin Infect Dis*, 15(6), 1003-1018. <https://doi.org/10.1093/clind/15.6.1003>
- Fraser, M., Borman, A. M., Thorn, R., & Lawrance, L. M. (2020). Resistance to echinocandin antifungal agents in the United Kingdom in clinical isolates of *Candida glabrata*: Fifteen years of interpretation and assessment. *Med Mycol*, 58(2), 219-226. <https://doi.org/10.1093/mmy/myz053>
- Garcia-Bustos, V., Salavert, M., Ruiz-Gaitan, A. C., Cabanero-Navalon, M. D., Sigona-Giangreco, I. A., & Peman, J. (2020). A clinical predictive model of candidaemia by *Candida auris* in previously colonized critically ill patients. *Clin Microbiol Infect*, 26(11), 1507-1513. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.02.001>
- Garcia-Effron, G. (2021). Molecular Markers of Antifungal Resistance: Potential Uses in Routine Practice and Future Perspectives. *J Fungi (Basel)*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/jof7030197>
- Garnaud, C., Botterel, F., Sertour, N., Bougnoux, M. E., Dannaoui, E., Larrat, S., Hennequin, C., Guinea, J., Cornet, M., & Maubon, D. (2015). Next-generation sequencing offers new insights into the resistance of *Candida* spp. to echinocandins and azoles. *J Antimicrob Chemother*, 70(9), 2556-2565. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv139>
- Girmenia, C., Tuccinardi, C., Santilli, S., Mondello, F., Monaco, M., Cassone, A., & Martino, P. (2000). In vitro activity of fluconazole and voriconazole against isolates of *Candida albicans* from patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother*, 46(3), 479-483. <https://doi.org/10.1093/jac/46.3.479>
- Groll, A. H., Buchheidt, D., Heinz, W., Bellmann, R., Cornely, O. A., Höhl, R., Hönigl, M., Kluge, S., Kurzai, O., Lass-Flörl, C., Lehrnbecher, T., Lichtenstern, C., Mendling, W., Rath, P., Rickerts, V., Schwartz, S., Willinger, B., Ruhnke, M.

- (2020). *S1 Leitlinie Diagnose und Therapie von Candida Infektionen: Gemeinsame Empfehlungen der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG) und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG)*. Hrsg.: Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, AWMF-Register Nr. 082/005. Juli 2020. von <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/082-005.html> (letzter Zugang am 17.06.2021)
- Hall, G. S., Myles, C., Pratt, K. J., & Washington, J. A. (1988). Cilofungin (LY121019), an antifungal agent with specific activity against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 32(9), 1331-1335. <https://doi.org/10.1128/aac.32.9.1331>
- Hamprecht, A., Barber, A. E., Mellinghoff, S. C., Thelen, P., Walther, G., Yu, Y., Neurgaonkar, P., Dandekar, T., Cornely, O. A., Martin, R., Kurzai, O., & German Candida auris Study, G. (2019). *Candida auris* in Germany and Previous Exposure to Foreign Healthcare. *Emerg Infect Dis*, 25(9), 1763-1765. <https://doi.org/10.3201/eid2509.190262>
- Hata, D. J., Humphries, R., Lockhart, S. R., & College of American Pathologists Microbiology Committee (2020). *Candida auris*: An Emerging Yeast Pathogen Posing Distinct Challenges for Laboratory Diagnostics, Treatment, and Infection Prevention. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 144(1), 107-114. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0508-RA>
- Hii, I. M., Liu, C. E., Lee, Y. L., Liu, W. L., Wu, P. F., Hsieh, M. H., Ho, M. W., Chen, Y. H., & Wang, F. D. (2019). Resistance rates of non-albicans *Candida* infections in Taiwan after the revision of 2012 Clinical and Laboratory Standards Institute breakpoints. *Infect Drug Resist*, 12, 235-240. <https://doi.org/10.2147/IDR.S184884>
- Hou, X., Lee, A., Jimenez-Ortigosa, C., Kordalewska, M., Perlin, D. S., & Zhao, Y. (2019). Rapid Detection of ERG11-Associated Azole Resistance and FKS-Associated Echinocandin Resistance in *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother*, 63(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01811-18>
- Hou, X., Xiao, M., Chen, S. C., Wang, H., Cheng, J. W., Chen, X. X., Xu, Z. P., Fan, X., Kong, F., & Xu, Y. C. (2016). Identification and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida haemulonii* Species Complex Clinical Isolates from a Multicenter Study in China. *J Clin Microbiol*, 54(11), 2676-2680. <https://doi.org/10.1128/JCM.01492-16>
- Hube, B. (2004). From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 7(4), 336-341. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.003>
- Hull, C. M., Bader, O., Parker, J. E., Weig, M., Gross, U., Warrilow, A. G., Kelly, D. E., & Kelly, S. L. (2012). Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in ERG2. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(12), 6417-6421. <https://doi.org/10.1128/AAC.01145-12>
- Ilkit, M., & Guzel, A. B. (2011). The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Crit Rev Microbiol*, 37(3), 250-261. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.576332>
- Jackson, B. R., Chow, N., Forsberg, K., Litvintseva, A. P., Lockhart, S. R., Welsh, R., Vallabhaneni, S., & Chiller, T. (2019). On the Origins of a Species: What Might

- Explain the Rise of *Candida auris*? *J Fungi (Basel)*, 5(3).  
<https://doi.org/10.3390/jof5030058>
- Jeffery-Smith, A., Taori, S. K., Schelenz, S., Jeffery, K., Johnson, E. M., Borman, A., Candida auris Incident Management Team, Manuel, R., & Brown, C. S. (2017). *Candida auris*: a Review of the Literature. *Clinical microbiology reviews*, 31(1), e00029-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-17>
- Kalb, V. F., Woods, C. W., Turi, T. G., Dey, C. R., Sutter, T. R., & Loper, J. C. (1987). Primary structure of the P450 lanosterol demethylase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA*, 6(6), 529-537. <https://doi.org/10.1089/dna.1987.6.529>
- Kathuria, S., Singh, P. K., Sharma, C., Prakash, A., Masih, A., Kumar, A., Meis, J. F., & Chowdhary, A. (2015). Multidrug-Resistant *Candida auris* Misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method. *J Clin Microbiol*, 53(6), 1823-1830. <https://doi.org/10.1128/JCM.00367-15>
- Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, J., & Iwasaki, S. (1989). The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature*, 341(6238), 164-166. <https://doi.org/10.1038/341164a0>
- Klingspor, L., Tortorano, A. M., Peman, J., Willinger, B., Hamal, P., Sendid, B., Velegriaki, A., Kibbler, C., Meis, J. F., Sabino, R., Ruhnke, M., Arikian-Akdagli, S., Salonen, J., & Doczi, I. (2015). Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). *Clin Microbiol Infect*, 21(1), 87 e81-87 e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.08.011>
- Koehler, P., Stecher, M., Cornely, O. A., Koehler, D., Vehreschild, M., Bohlius, J., Wisplinghoff, H., & Vehreschild, J. J. (2019). Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*, 25(10), 1200-1212. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.024>
- Kordalewska, M., Lee, A., Park, S., Berrio, I., Chowdhary, A., Zhao, Y., & Perlin, D. S. (2018). Understanding Echinocandin Resistance in the Emerging Pathogen *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(6). <https://doi.org/10.1128/AAC.00238-18>
- Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. (2015). Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*, 373(15), 1445-1456. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1315399>
- Lackner, M., Tscherner, M., Schaller, M., Kuchler, K., Mair, C., Sartori, B., Istel, F., Arendrup, M. C., & Lass-Flörl, C. (2014). Positions and numbers of FKS mutations in *Candida albicans* selectively influence in vitro and in vivo susceptibilities to echinocandin treatment. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(7), 3626-3635. <https://doi.org/10.1128/AAC.00123-14>
- Lamb, D. C., Kelly, D. E., Schunck, W. H., Shyadehi, A. Z., Akhtar, M., Lowe, D. J., Baldwin, B. C., & Kelly, S. L. (1997). The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J Biol Chem*, 272(9), 5682-5688. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5682>

- Laniado-Laborin, R., & Cabrales-Vargas, M. N. (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista iberoamericana de micología*, 26(4), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.06.003>
- Laverdiere, M., Lalonde, R. G., Baril, J. G., Sheppard, D. C., Park, S., & Perlin, D. S. (2006). Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. *J Antimicrob Chemother*, 57(4), 705-708. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1022>
- Lee, W. G., Shin, J. H., Uh, Y., Kang, M. G., Kim, S. H., Park, K. H., & Jang, H. C. (2011). First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *J Clin Microbiol*, 49(9), 3139-3142. <https://doi.org/10.1128/JCM.00319-11>
- Lockhart, S. R., Etienne, K. A., Vallabhaneni, S., Farooqi, J., Chowdhary, A., Govender, N. P., Colombo, A. L., Calvo, B., Cuomo, C. A., Desjardins, C. A., Berkow, E. L., Castanheira, M., Magobo, R. E., Jabeen, K., Asghar, R. J., Meis, J. F., Jackson, B., Chiller, T., & Litvintseva, A. P. (2017). Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis*, 64(2), 134-140. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw691>
- Lockhart, S. R., Iqbal, N., Cleveland, A. A., Farley, M. M., Harrison, L. H., Bolden, C. B., Baughman, W., Stein, B., Hollick, R., Park, B. J., & Chiller, T. (2012). Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol*, 50(11), 3435-3442. <https://doi.org/10.1128/JCM.01283-12>
- Lombardi, G., Farina, C., Andreoni, S., Fazii, P., Faggi, E., Pini, G., Manso, E., Nanetti, A., & Mazzoni, A. (2004). Comparative evaluation of Sensititre YeastOne vs. the NCCLS M27A protocol and E-test for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Mycoses*, 47(9-10), 397-401. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2004.01013.x>
- Magobo, R. E., Corcoran, C., Seetharam, S., & Govender, N. P. (2014). *Candida auris*–Associated Candidemia, South Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), 1250-1251. <https://doi.org/10.3201/eid2007.131765>
- Marcos-Zambrano, L. J., Escribano, P., Sanchez-Carrillo, C., Bouza, E., & Guinea, J. (2016). Scope and frequency of fluconazole trailing assessed using EUCAST in invasive *Candida* spp. isolates. *Med Mycol*, 54(7), 733-739. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw033>
- Markantonatou, A. M., Samaras, K., Zachrou, E., & Vyzantiadis, T. A. (2020). Comparison of Four Methods for the *in vitro* Susceptibility Testing of Dermatophytes. *Frontiers in microbiology*, 11, 1593. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01593>
- Martel, C. M., Parker, J. E., Bader, O., Weig, M., Gross, U., Warrillow, A. G., Kelly, D. E., & Kelly, S. L. (2010). A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14 $\alpha$ -demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(9), 3578-3583. <https://doi.org/10.1128/AAC.00303-10>
- Massey, S. E., Moura, G., Beltrao, P., Almeida, R., Garey, J. R., Tuite, M. F., & Santos, M. A. (2003). Comparative evolutionary genomics unveils the molecular

- mechanism of reassignment of the CTG codon in *Candida* spp. *Genome Res*, 13(4), 544-557. <https://doi.org/10.1101/gr.811003>
- Mesa-Arango, A. C., Scorzoni, L., & Zaragoza, O. (2012). It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol*, 3, 286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00286>
- Munoz, J. F., Gade, L., Chow, N. A., Loparev, V. N., Juieng, P., Berkow, E. L., Farrer, R. A., Litvintseva, A. P., & Cuomo, C. A. (2018). Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. *Nat Commun*, 9(1), 5346. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07779-6>
- NEW ENGLAND BIOLABS<sup>®</sup> INC (2014). N7554 Datasheet-Lot0061306 for Biotinylated 2-Log DNA Ladder (0.1-10 kb). von <https://international.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/n7554datasheet-lot0061306.pdf?rev=8ae4fdd4dcfc43c195576388e270d096> (letzter Zugriff am 27.04.2021)
- Nucci, M., & Anaissie, E. (2001). Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis*, 33(12), 1959-1967. <https://doi.org/10.1086/323759>
- Nunnally, N. S., Etienne, K. A., Angulo, D., Lockhart, S. R., & Berkow, E. L. (2019). *In Vitro* Activity of Ibrexafungerp, a Novel Glucan Synthase Inhibitor against *Candida glabrata* Isolates with *FKS* Mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(11), e01692-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01692-19>
- Oberoi, J. K., Wattal, C., Goel, N., Raveendran, R., Datta, S., & Prasad, K. (2012). Non-albicans *Candida* species in blood stream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. *Indian J Med Res*, 136(6), 997-1003. von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3612330/> (letzter Zugang am 29.06.2021)
- Oura, M., Sternberg, T. H., & Wright, E. T. (1955). A new antifungal antibiotic, amphotericin B. *Antibiot Annu*, 3, 566-573. von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13355328> (letzter Zugriff 27.06.2021)
- Papon, N., Noel, T., Florent, M., Gibot-Leclerc, S., Jean, D., Chastin, C., Villard, J., & Chapeland-Leclerc, F. (2007). Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(1), 369-371. <https://doi.org/10.1128/AAC.00824-06>
- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*, 4, 18026. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Diekema, D. J., Messer, S. A., Moet, G. J., & Jones, R. N. (2010). Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol*, 48(5), 1592-1599. <https://doi.org/10.1128/JCM.02445-09>
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Messer, S. A., Rhomberg, P. R., & Jones, R. N. (2014). Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 79(2), 198-204. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.004>

- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., & International Fungal Surveillance Participant, G. (2004). Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect*, *10 Suppl 1*, 11-23. <https://doi.org/10.1111/j.1470-9465.2004.t01-1-00844.x>
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Turnidge, J. D., Castanheira, M., & Jones, R. N. (2019). Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997-2016. *Open Forum Infect Dis*, *6*(Suppl 1), S79-S94. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy358>
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., Woosley, L. N., Jones, R. N., & Castanheira, M. (2013). Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol*, *51*(8), 2571-2581. <https://doi.org/10.1128/JCM.00308-13>
- Pfaller, M. A., Rhomberg, P. R., Messer, S. A., Jones, R. N., & Castanheira, M. (2015). Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *82*(4), 303-313. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.008>
- Pfaller, M. A., Watanabe, N., Castanheira, M., Messer, S. A., & Jones, R. N. (2011). Pre-clinical development of antifungal susceptibility test methods for the testing of the novel antifungal agent E1210 versus *Candida*: comparison of CLSI and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing methods. *J Antimicrob Chemother*, *66*(11), 2581-2584. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr342>
- Polak, A., & Scholer, H. J. (1975). Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy*, *21*(3-4), 113-130. <https://doi.org/10.1159/000221854>
- Prestel, C., Anderson, E., Forsberg, K., Lyman, M., de Perio, M. A., Kuhar, D., Edwards, K., Rivera, M., Shugart, A., Walters, M., & Dotson, N. Q. (2021). *Candida auris* Outbreak in a COVID-19 Specialty Care Unit - Florida, July-August 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *70*(2), 56-57. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7002e3>
- Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*, *25*(7), 792-798. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>
- Rex, J. H., & Pfaller, M. A. (2002). Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis*, *35*(8), 982-989. <https://doi.org/10.1086/342384>
- Rhodes, J., Abdolrasouli, A., Farrer, R. A., Cuomo, C. A., Aanensen, D. M., Armstrong-James, D., Fisher, M. C., & Schelenz, S. (2018). Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen *Candida auris*. *Emerging Microbes & Infections*, *7*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0045-x>
- Rudramurthy, S. M., Chakrabarti, A., Paul, R. A., Sood, P., Kaur, H., Capoor, M. R., Kindo, A. J., Marak, R. S. K., Arora, A., Sardana, R., Das, S., Chhina, D., Patel, A., Xess, I., Tarai, B., Singh, P., & Ghosh, A. (2017). *Candida auris*

- candidaemia in Indian ICUs: analysis of risk factors. *J Antimicrob Chemother*, 72(6), 1794-1801. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx034>
- Ruiz-Gaitan, A., Moret, A. M., Tasiias-Pitarch, M., Aleixandre-Lopez, A. I., Martinez-Morel, H., Calabuig, E., Salavert-Lleti, M., Ramirez, P., Lopez-Hontangas, J. L., Hagen, F., Meis, J. F., Mollar-Maseres, J., & Peman, J. (2018). An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital. *Mycoses*, 61(7), 498-505. <https://doi.org/10.1111/myc.12781>
- Rybak, J. M., Munoz, J. F., Barker, K. S., Parker, J. E., Esquivel, B. D., Berkow, E. L., Lockhart, S. R., Gade, L., Palmer, G. E., White, T. C., Kelly, S. L., Cuomo, C. A., & Rogers, P. D. (2020). Mutations in TAC1B: a Novel Genetic Determinant of Clinical Fluconazole Resistance in *Candida auris*. *mBio*, 11(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00365-20>
- Sabra, R., & Branch, R. A. (1990). Amphotericin B nephrotoxicity. *Drug Saf*, 5(2), 94-108. <https://doi.org/10.2165/00002018-199005020-00003>
- Safdar, A., Ma, J., Saliba, F., Dupont, B., Wingard, J. R., Hachem, R. Y., Mattiuzzi, G. N., Chandrasekar, P. H., Kontoyannis, D. P., Rolston, K. V., Walsh, T. J., Champlin, R. E., & Raad, II. (2010). Drug-induced nephrotoxicity caused by amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B: a review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 89(4), 236-244. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3181e9441b>
- Sanguinetti, M., & Posteraro, B. (2018). Susceptibility Testing of Fungi to Antifungal Drugs. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 4(3), 110. <https://doi.org/10.3390/jof4030110>
- Santos, M. A., & Tuite, M. F. (1995). The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res*, 23(9), 1481-1486. <https://doi.org/10.1093/nar/23.9.1481>
- Satoh, K., Makimura, K., Hasumi, Y., Nishiyama, Y., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (2009). *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol*, 53(1), 41-44. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x>
- Schelenz, S., Hagen, F., Rhodes, J. L., Abdolrasouli, A., Chowdhary, A., Hall, A., Ryan, L., Shackleton, J., Trimlett, R., Meis, J. F., Armstrong-James, D., & Fisher, M. C. (2016). First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control*, 5, 35. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0132-5>
- Schulze, J., & Sonnenborn, U. (2009). Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Dtsch Arztebl Int*, 106(51-52), 837-842. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0837>
- Sheehan, D. J., Hitchcock, C. A., & Sibley, C. M. (1999). Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev*, 12(1), 40-79. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.40>
- Silva, M. C., Cardozo Bonfimo Carbone, D., Diniz, P. F., Freitas Fernandes, F., Fuzo, C. A., Santos Pereira Cardoso Trindade, C., Rodrigues Chang, M., & Silva, J. S. (2020). Modulation of ERG Genes Expression in Clinical Isolates of *Candida tropicalis* Susceptible and Resistant to Fluconazole and Itraconazole. *Mycopathologia*, 185(4), 675-684. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00465-6>
- Singh, S., Uppuluri, P., Mamouei, Z., Alqarihi, A., Elhassan, H., French, S., Lockhart, S. R., Chiller, T., Edwards, J. E., Jr., & Ibrahim, A. S. (2019). The NDV-3A



- vaccine protects mice from multidrug resistant *Candida auris* infection. *PLoS Pathog*, 15(8), e1007460. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007460>
- Sokol-Anderson, M., Sligh, J. E., Jr., Elberg, S., Brajtburg, J., Kobayashi, G. S., & Medoff, G. (1988). Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*, 32(5), 702-705. <https://doi.org/10.1128/AAC.32.5.702>
- Soll, D. R., Staebell, M., Langtimm, C., Pfaller, M., Hicks, J., & Rao, T. V. (1988). Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic infection. *Journal of clinical microbiology*, 26(8), 1448–1459. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.8.1448-1459.1988>
- Spettel, K., Barousch, W., Makristathis, A., Zeller, I., Nehr, M., Selitsch, B., Lackner, M., Rath, P. M., Steinmann, J., & Willinger, B. (2019). Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. *PLoS One*, 14(1), e0210397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210397>
- Takahashi, Y., Nagata, N., Shimbo, T., Nishijima, T., Watanabe, K., Aoki, T., Sekine, K., Okubo, H., Watanabe, K., Sakurai, T., Yokoi, C., Kobayakawa, M., Yazaki, H., Teruya, K., Gatanaga, H., Kikuchi, Y., Mine, S., Igari, T., Takahashi, Y., Mimori, A., Oka, S., Akiyama, J., & Uemura, N. (2015). Long-Term Trends in Esophageal Candidiasis Prevalence and Associated Risk Factors with or without HIV Infection: Lessons from an Endoscopic Study of 80,219 Patients. *PLoS One*, 10(7), e0133589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133589>
- Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J, and The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2020). Routine and extended internal quality control for MIC determination and agar dilution for yeasts, moulds and dermatophytes as recommended by EUCAST. Version 5.0, 2020. von <https://www.eucast.org/astoffungi/qcafsttables/> (letzter Zugriff am 29.05.2021)
- Thermo Fischer Scientific Inc. (2016). Instructions for Use. Thermo Scientific Sensititre™ YeastOne™ YO10 AST Plates, 029-YEAST – ROW-IVD CID9552 Revision Date: December 07th, 2016. von <https://www.thermofisher.com/> (letzter Zugriff 05.05.2020)
- Uribe, B., Yaldebere, A., Gonzalez, O., Guruceaga, X., Ramirez-Garcia, A., Rementeria, A., Ba, B. B., Gaudin, K., & Alonso, R. M. (2022). Study of antifungal agent caspofungin adsorption to laboratory materials. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1188, 123060. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123060>
- Vallabhaneni, S., Kallen, A., Tsay, S., Chow, N., Welsh, R., Kerins, J., Kemble, S. K., Pacilli, M., Black, S. R., Landon, E., Ridgway, J., Palmore, T. N., Zelzany, A., Adams, E. H., Quinn, M., Chaturvedi, S., Greenko, J., Fernandez, R., Southwick, K., Furuya, E. Y., Calfee, D. P., Hamula, C., Patel, G., Barrett, P., Lafaro, P., Berkow, E. L., Moulton-Meissner, H., Noble-Wang, J., Fagan, R. P., Jackson, B. R., Lockhart, S. R., Litvintseva, A. P., & Chiller, T. M. (2017). Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus-United States, May 2013–August 2016. *Am J Transplant*, 17(1), 296-299. <https://doi.org/10.1111/ajt.14121>

- Vandeputte, P., Tronchin, G., Larcher, G., Ernoult, E., Berges, T., Chabasse, D., & Bouchara, J. P. (2008). A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*, *52*(10), 3701-3709. <https://doi.org/10.1128/AAC.00423-08>
- Vanstraelen, K., Lagrou, K., Maertens, J., Wauters, J., Willems, L., & Spriet, I. (2013). The Eagle-like effect of echinocandins: what's in a name? *Expert Rev Anti Infect Ther*, *11*(11), 1179-1191. <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.841543>
- Vermes, A., Guchelaar, H. J., & Dankert, J. (2000). Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother*, *46*(2), 171-179. <https://doi.org/10.1093/jac/46.2.171>
- Villanueva-Lozano, H., Trevino-Rangel, R. J., Gonzalez, G. M., Ramirez-Elizondo, M. T., Lara-Medrano, R., Aleman-Bocanegra, M. C., Guajardo-Lara, C. E., Gaona-Chavez, N., Castilleja-Leal, F., Torre-Amione, G., & Martinez-Resendez, M. F. (2021). Outbreak of *Candida auris* infection in a COVID-19 hospital in Mexico. *Clin Microbiol Infect*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.030>
- Viviani, M. A. (1995). Flucytosine--what is its future? *J Antimicrob Chemother*, *35*(2), 241-244. <https://doi.org/10.1093/jac/35.2.241>
- Wagener, J., Kurzai, O. (2019). SUPPLEMENT: Perspektiven der Infektiologie. *Candida auris*: Steckbrief eines neuen Pilzes. von [www.aerzteblatt.de/lit2919](http://www.aerzteblatt.de/lit2919)
- Welsh, R. M., Bentz, M. L., Shams, A., Houston, H., Lyons, A., Rose, L. J., & Litvintseva, A. P. (2017). Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface. *J Clin Microbiol*, *55*(10), 2996-3005. <https://doi.org/10.1128/JCM.00921-17>
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, *39*(3), 309-317. <https://doi.org/10.1086/421946>
- Woodworth, M. H., Dynerman, D., Crawford, E. D., Doernberg, S. B., Ramirez-Avila, L., Serpa, P. H., Nichols, A., Li, L. M., Lyden, A., Tato, C. M., Miller, S., Derisi, J. L., & Langelier, C. (2019). Sentinel Case of *Candida auris* in the Western United States Following Prolonged Occult Colonization in a Returned Traveler from India. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, *25*(5), 677-680. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0408>
- Yamaguchi, H., Uchida, K., Nagino, K., & Matsunaga, T. (2002). Usefulness of a colorimetric method for testing antifungal drug susceptibilities of *Aspergillus* species to voriconazole. *J Infect Chemother*, *8*(4), 374-377. <https://doi.org/10.1007/s10156-002-0201-y>
- Zhu, Y., O'Brien, B., Leach, L., Clarke, A., Bates, M., Adams, E., Ostrowsky, B., Quinn, M., Dufort, E., Southwick, K., Erazo, R., Haley, V. B., Bucher, C., Chaturvedi, V., Limberger, R. J., Blog, D., Lutterloh, E., & Chaturvedi, S. (2020). Laboratory Analysis of an Outbreak of *Candida auris* in New York from 2016 to 2018: Impact and Lessons Learned. *J Clin Microbiol*, *58*(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.01503-19>

## Appendix

### I. Abkürzungsverzeichnis

AB	Amphotericin B
AFST	Antifungal Susceptibility Testing/Antimykotische Resistenztestungen
AND	Anidulafungin
AP-Streifen	Amphotericin B-E-Teststreifen
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser.
BSI	Blutstrominfektion/Candidämie
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. auris</i>	<i>Candida auris</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. pseudohaemulonii</i>	<i>Candida pseudohaemulonii</i>
CA	<i>C. auris</i> Isolat für Microdilutionsplatte nach EUCAST
CAS	Casposfungin
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Chr.	Chromosom
CK	<i>C. krusei</i> CFI4 als Referenzstamm für Microdilutionsplatte nach EUCAST
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)
CNV	Kopienzahlvariante
CS-Streifen	Casposfungin-E-Teststreifen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMykG	Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft
DNA	Desoxyribonucleinsäure

DS	C. auris Isolat DSMZ 21092 als Referenzstamm für Microdilutionsplatte nach EUCAST
E-Test	Epsilometertest
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FC	5-Flucytosin
for	Forward
FUR1	Uracil-Phosphoribosyltransferase
FZ	Fluconazol
GB	Vereinigtes Königreich Großbritannien
ICU	Intensive Care Unit/Intensivstation
IGV	Integrative Genomics Viewer
in vivo	Im lebendigen Organismus ablaufend
IST	Internal-Transcribed-Spacer-Region
IZ	Itraconazol
LGC	Leading Global Life Science Tools Company
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
max.	Maximal
MD	Microdilutionsplatten nach EUCAST
MF	Micafungin
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min.	Mindestens
MOPS	Morpholino-Propansulfonsäure
MW	Mittelwert
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
Nr.	Nummer

NRZMyk	Nationales Referenzzentrum für invasive Pilzinfektionen
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie
PZ	Posaconazol
QC	Qualitätskontrolle
qPCR	Real-Time-Quantitative-PCR
rev	Reverse
RPMI	Gibco Roswell Park Memorial Institute
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
STABW	Standardabweichung
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VOR	Voriconazol
VO-Streifen	Voriconazol-E-Teststreifen
VR	Versuchsreihe
vs.	Versus
WGS	Whole Genome Sequencing
WHO	World Health Organization
YDP	Yeast Extract-Peptone-Dextrose
YO-Platten	Sensititre™ YeastOne™ YO10 AST Plates von Thermo Scientific™/Mikrodilutionsplatten nach CLSI

## Einheiten

%	Prozent
°C	Temperatur (Grad Celcius)
c	Konzentration
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
bp	Basenpaar
CFU	Koloniebildende Einheit
xg	Relative Zentrifugalkraft (Vielfaches der Erdbeschleunigung)
h	Stunde
kb	Kilobase
l	Liter
M	Stoffmengenkonzentration (Molar)
min	Minute
ml	Mililiter
ng	Nanogramm
sec	Sekunden
OD	Optische Dichte

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Belegungsschema YO-Platten .....	12
Abbildung 2: Belegungsschema Mikrodilutionsplatten nach EUCAST .....	14
Abbildung 3: 2-Log DNA-Leiter .....	21
Abbildung 4: Patientendaten und Chronologie des Probengewinns .....	29
Abbildung 5: Repräsentative Auswertung der YO-Platten für NRZ-2017-394-4 mit Trailing-Effekt .....	31
Abbildung 6: Zeitpunktabhängiges Wachstum im Mikrodilutionsverfahren nach EUCAST ohne Resazurin mit Caspofungin als Wirkstoff .....	34
Abbildung 7: Vergleich Microdilution nach EUCAST (mit/ohne Resazurin) .....	36
Abbildung 8: Repräsentative Auswertung des E-Test-Verfahrens .....	40
Abbildung 9: Abweichung der MHK-Werte bei AP-Streifen für NRZ-2017-505/1-3 .....	45
Abbildung 10: Abweichung der MHK-Werte bei VO-Streifen für NRZ-2017-505/1-3 .....	46
Abbildung 11: Darstellung der Primer für den FKS1-Hot Spot 1/-2 und Größe der abgelesenen PCR-Produkte .....	47
Abbildung 12: Geldokumentation der PCR-Produkte für FKS1-Hot Spot 1/-2 ....	49
Abbildung 13: Basensubstitution bei Mutationen im FKS1 Hot Spot 1.....	50
Abbildung 14: Darstellung des Primers für ERG11-Region und Größe des abgelesenen PCR-Produkt.....	51
Abbildung 15: Geldokumentation der PCR-Produkte der ERG11-Region .....	52
Abbildung 16: Basensubstitution bei Mutationen im ERG11-Gen .....	53
Abbildung 17: Phylogenetische Verwandtschaft und geographische Herkunft der Isolate .....	56

## Erlaubnis zur Veröffentlichung/Publikation in Dissertation

Hiermit ich erlaube ich,

Frau Dr. Dr. Michaela Herz,

Herrn Sebastian Ebner

die Nutzung/Publikation der Abbildung „**Phylogenetische Verwandtschaft und geographische Herkunft deutscher *C. auris* Isolate**“ (in Abbildung 1 dargestellt) zur Veröffentlichung in der Dissertationsschrift „Antimykotikaresistenzen bei deutschen *Candida auris* Isolaten“ und weiterhin zur öffentlichen Präsentation bei dem noch folgenden Colloquium/Rigorosum zur Verteidigung derselben Dissertationsschrift. Der Empfänger erklärt sich bereit die Abbildung ausschließlich für die oben genannten Anlässe zu nutzen.

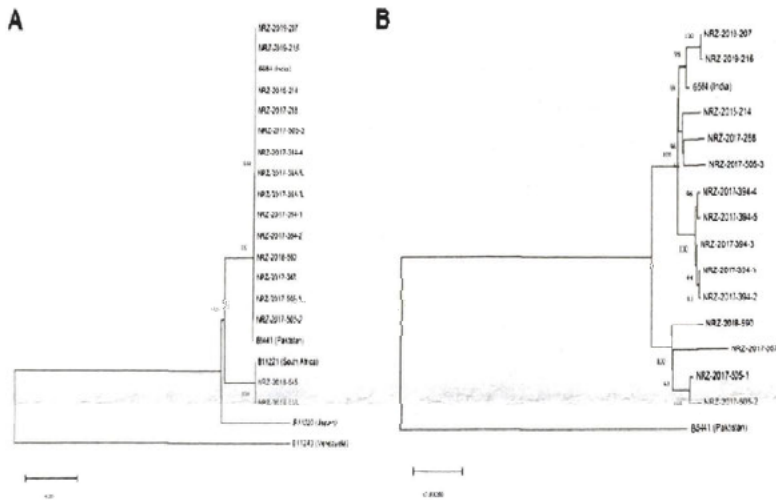


Abbildung 1: Phylogenetische Verwandtschaft und geographische Herkunft deutscher *C. auris* Isolate

Würzburg, am 26.05.22

Dr. Dr. Michaela Herz

Sebastian Ebner



### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete <i>Candida</i> sp.-Stämme.....	10
Tabelle 2: Rezept RPMI 2 % G Medium .....	13
Tabelle 3: Konzentrationseinstellung Mikrodilutionsplatten nach EUCAST.....	15
Tabelle 4: Herstellung Lysispuffer.....	17
Tabelle 5: Herstellung Ethanol 70 %.....	17
Tabelle 6: PCR-Ansatz.....	19
Tabelle 7: Primerliste .....	19
Tabelle 8: PCR-Programm .....	19
Tabelle 9: Herstellung von TAE 1x Puffer.....	21
Tabelle 10: Herstellung Agarosegel 1 % .....	21
Tabelle 11: Ansatz Sanger-Sequenzierung.....	22
Tabelle 12: Quelle der Genomsequenzen und phylogenetische Herkunft der <i>C. auris</i> Referenzstämme .....	23
Tabelle 13: Materialliste .....	24
Tabelle 14: Geräteliste und verwendete Programme.....	26
Tabelle 15: Auslandsaufenthalte der Patienten und eingesetzte Therapeutika.....	28
Tabelle 16: MHK-Werte für YO-Platten .....	33
Tabelle 17: MHK-Werte für Mikrodilutionstest nach EUCAST mit Caspofungin	35
Tabelle 18: MHK-Werte für Mikrodilutionstest nach EUCAST mit Anidulafungin (mit/ohne Resazurin).....	38
Tabelle 19: Vergleich der Echinocandin-MHK-Werte für das YO-Platten- und Mikrodilutionsverfahren nach EUCAST .....	39
Tabelle 20: Vergleich Amphotericin B-MHK-Werte für das E-Test- und YO-Platten-Verfahren .....	41
Tabelle 21: Vergleich Caspofungin-MHK-Werte für das E-Test- und YO-Platten-Verfahren .....	42
Tabelle 22: Vergleich Voriconazol-MHK-Werte für das E-Test- und YO-Platten-Verfahren .....	43

<b>Tabelle 23: Detektierte Mutationen in FKS1 Hot Spot 1 Region mit Aminosäuresubstitution .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 24: Mutationen in der ERG11-Region mit Aminosäuresubstitution .....</b>	<b>54</b>

## **IV. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Oliver Kurzai und Dr. Ronny Martin für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der gesamten Arbeit. Vielen Dank für die stete Erreichbarkeit, alle Ermutigungen und die umfangreiche Einarbeitung. Ferner möchte ich mich an die gesamte Forschungsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. Kurzai (Institut für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg) wenden. Vielen Dank dafür, dass durch diese Arbeit mein Interesse für die Forschung auf so vielfältige Art und Weise geweckt wurde.

Des Weiteren möchte ich bei Dr. Dr. Michaela Herz, Alexander Maximilian Aldejohann und der Forschungsgruppe Fungal Septomics (Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie Hans-Knöll-Institut, Jena) für alle gegebenen Ratschläge, die fürsorgliche Betreuung und den fachlichen Austausch im Rahmen dieses Projektes bedanken. Meinen großen Dank äußern möchte ich zudem Sabrina Speiser für die fundamentale organisatorische Hilfe und die Unterstützung bei dieser Arbeit. Danke für alle reibungslosen Abläufe und das stetige offene Ohr bei Komplikationen.

Zudem danke ich Dr. Dr. Michaela Herz für die freundliche Genehmigung zur Verwendung der Graphik „Phylogenetische Verwandtschaft und geographische Herkunft der Isolate“.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen lieben Eltern Josef und Edeltraud Ebner, meiner Schwester Julia Ebner-Dischinger, Johannes Dischinger und insbesondere Kim und Felicitas Grebe. Ohne eure aufmunternden Worte, eure stete Unterstützung und nicht zuletzt die fortdauernde Geduld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.