

**AUS DER KINDERKLINIK UND POLIKLINIK**

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Ch. P. Speer

**Kolonisierung mit Pilzen bei intensivmedizinisch behandelten  
Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht  $\leq 1500\text{g}$  und  
einem Lebensalter  $\leq 28$  Tage**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Pamela Meyer

aus Dettelbach

Würzburg, Oktober 2004

Referent: PD Dr. med. Frank-Michael Müller  
Koreferent: Prof. Dr.med. M. Frosch  
Dekan: Prof. Dr.med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2005

Die Promovendin ist Ärztin

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>7</b>
2.1.	STUDIENDURCHFÜHRUNG	7
2.2.	MATERIAL	10
2.3.	METHODEN	11
2.3.1.	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	11
2.3.2.	Auswertung der MHK-Werte	14
2.3.3.	Allgemein	14
2.3.4.	DNA-Extraktion	16
2.3.5.	Molekularbiologische Typisierung mittels RAPD-PCR	19
2.3.6.	Molekularbiologische Typisierung mittels IR-PCR	21
2.3.7.	Southern-Hybridisierung	22
2.3.8.	Auswertung der molekularbiologischen Typisierung	26
2.3.9.	Einteilung des Schweregrads nach Isolationsort	28
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISTEIL</b>	<b>29</b>
3.1.	ANGABEN ZU DEN PATIENTENDATEN (FORMBLATT 2)	29
3.2.	FOLLOW-UP (FORMBLATT 3)	37
3.3.	SYSTEMISCHE INFEKTIONEN (FORMBLATT 4)	38
3.3.1.	Isolationsorte bei systemischer Infektion	39
3.3.2.	Einteilung systemischer Infektionen in Schweregrade	39
3.3.3.	Besiedlung und spätere Entwicklung einer systemischen Infektion	39
3.3.4.	Erregerspektrum bei systemischer Infektion	40
3.3.5.	Übersicht der Patientendaten mit systemischer Pilzinfektion	41
3.3.6.	Antimykotische Therapie	42
3.4.	ERGEBNISSE DER MHK	43
3.4.1.	MHK-Werte der Kontrollstämme	43
3.4.2.	MHK-Werte aller Isolate	44
3.4.3.	Resistenzdaten einzelner Isolate	45
3.5.	ERGEBNISSE DER VERSCHIEDENEN MOLEKULARBIOLOGISCHEN TYPISIERUNGSMETHODEN	46
3.5.1.	Verwandtschaftsgrad der Gruppe <i>C. albicans</i>	46

3.5.2.	Verwandtschaftsgrad der Gruppe <i>C. parapsilosis</i>	49
3.5.3.	Verwandtschaftsgrad der Gruppe <i>C. lusitaniae</i>	51
3.5.4.	Verwandtschaftsgrad der Gruppe <i>C. guilliermondii</i>	53
3.5.5.	Verwandtschaftsgrad der restlichen <i>Candida</i> -Isolate	54
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>54</b>
4.1.	ALLGEMEINE PATIENTENDATEN AM ABSTRICHTAG	55
4.2.	SYSTEMISCHE INFEKTIONEN IM FOLLOW-UP-INTERVALL (FORMBLATT 3/4)	66
4.2.1.	Isolationsorte bei systemischer Infektion	68
4.2.2.	Schweregrade der systemischen Infektionen	69
4.2.3.	Kolonisationsstatus am Abstrichtag im Zusammenhang mit der Entwicklung einer systemischen Infektion	70
4.2.4.	Erregerspektrum	71
4.2.5.	Individuelle Patientendaten bei systemischer Infektion	73
4.2.6.	Antimykotische Therapie systemischer Pilzinfektionen	75
4.3.	IN VITRO EMPFINDLICHKEITSVERHALTEN VERSCHIEDENER <i>CANDIDA</i> - SPEZIES GEGENÜBER ANTIMYKOTIKA	76
4.4.	BEURTEILUNG DER MOLEKULARBIOLOGISCHEN VERWANDTSCHAFT UNTERSCHIEDLICHER <i>CANDIDA</i> -SPEZIES	79
4.4.1.	Molekularbiologische Untersuchungsmethoden	79
4.4.2.	Vergleich genotypischer Charakteristika aller <i>Candida</i> -Isolate	86
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	

# 1. Einleitung

## Allgemein

In den letzten zwei Dekaden ist es zu einem Anstieg systemischer Pilzinfektionen beim Menschen gekommen {1,2}. Hauptursachen hierfür sind in der Zunahme an Patienten mit einer angeborenen oder erworbenen Störung ihrer Abwehrfunktion zu sehen, wie zum Beispiel HIV-, onkologische oder organtransplantierte Patienten, ebenso Patienten, die sich einer Hochdosischemotherapie unterziehen. Weiterhin treten *Candida*-Infektionen bei Patienten mit Wundinfektionen, chronischem Nierenversagen, Magentumoren, Verbrennungen dritten Grades, Leberzirrhose, intrakraniellen Blutungen, Tuberkulose-Meningitis und verstärkt bei unreifen Frühgeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht auf {3,4,5,6,7,8,9,10}. Diese Zunahme der Pilzinfektionen brachten Mathaba et al. {1} in Zusammenhang mit dem Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika oder zytotoxischen und immunsuppressiven Medikamenten. Kossoff et al. {11} sahen einen Anstieg der *Candidämie*-Rate zwischen 1981 bis 1995 um das mehr als 11fache. Laut Santos et al. {12} sind 15% der Infektionen durch *Candida*-Spezies verursacht. Zwischen 1986 und 1990 wurden *Candida*-Spezies als sechsthäufigste Pathogene in einer krankenhausesweiten Übersicht ermittelt {13}. Unter nosokomialen Infektionen rangierten sie sogar auf dem vierten Platz und verursachten 10,2% der Septikämien und 2,5% aller Urogenitaltrakt-Infektionen. Die *Candidiasis* repräsentiert die häufigste nosokomiale Pilzinfektion bei Immunsupprimierten, dicht gefolgt von invasiven Aspergillosen {13}. Begünstigende Faktoren zur Entstehung von systemischen *Candida*-Infektionen bei Frühgeborenen stellen vor allem die extreme Unreife der Organfunktionen und das niedrige Geburtsgewicht dar. Hinzu kommt die noch insuffiziente Granulozytenfunktion, die sich in einer unzureichenden Granulozytenanzahl, Chemotaxis und Phagozytosefähigkeit zeigt, ebenso wie eine ineffektive T-Zell-Abwehr {8,14,15}. Die überwiegende Mehrheit der humanen Pilzinfektionen wird von *C. albicans* {2}, einem opportunistischem Pathogen {16}, der als Kommensale in der Mundflora und im Verdauungs- bzw. Vaginaltrakt des menschlichen Organismus zu finden ist {16,17}, verursacht. Je nach Patientengut und Immunstatus der Patienten werden zunehmend andere Vertreter der *Candida*-Spezies als Verursacher von Pilzinfektionen genannt. Hierzu zählen *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* und *C. krusei* {3,14,18,19, 20,21,22,23}. So steigt die Anzahl der *Candidiasis*, die durch *C. parapsilosis* verursacht werden vor allem bei Frühgeborenen

{11,24} stark an, meist im Zusammenhang mit langen Liegezeiten von zentralen Venenkathetern {25}. Bei immunkompetenten Patienten stellen *Candida*-Spezies keine Gefahr für die Gesundheit des Patienten dar, da humorale und zelluläre Abwehr ein Gegengewicht bilden. Gerät dieses System aus dem Gleichgewicht, kommt es zum verstärkten Ausbruch von Infektionen mit opportunistischen Erregern. Gerade Frühgeborene weisen aufgrund ihrer Unreife eine unzureichende Immunkompetenz auf und besitzen somit nicht die Fähigkeit spezifisch, auf verschiedene Antigene zu reagieren {26}. Durch die Zunahme der Inzidenz von *Candida*-Infektionen wurden zahlreiche Untersuchungen und Studien zur Erforschung der Biologie, der Pathogenitätsmechanismen, der Virulenzfaktoren und der Entwicklung von Resistenzmechanismen dieser Spezies angestrengt. Da die Vertreter der *Candida*-Spezies in zunehmenden Maße resistent gegen Antimykotika werden {27,28}, steht das Interesse an der Entstehung der Resistenzen und die damit verbundene Entwicklung neuer Medikamente im Zentrum vieler Untersuchungen. Des Weiteren fehlen immer noch allgemein standardisierte, einfache und schnell reproduzierbare Techniken zur Identifizierung von *Candida*-Spezies bei invasiven Infektionen bereits in der Frühphase der Erkrankung, um gezielt therapeutisch intervenieren zu können, und somit auch der steigenden Resistenzentwicklung entgegen zu wirken.

### Ziel der Arbeit

Ziel dieser Studie war es, einen möglichst repräsentativen Querschnitt der Kolonisationsrate mit Pilzen bei Risikofrühgeborenen mit einem Geburtsgewicht  $\leq 1500\text{g}$  und einem Lebensalter  $\leq 28$  Tagen auf Bundesebene am vorgesehenen Stichtag (29.05.2001) zu erheben. Weiterhin sollten Beziehungen zwischen den Kolonisations- und Infektionsraten und ein Zusammenhang mit möglichen Risikofaktoren für eine Kolonisation untersucht werden. Ebenso standen die Informationsgewinnung hinsichtlich der antimikrobiellen Empfindlichkeit der isolierten Erreger und eine Korrelation dieser Befunde mit dem Einsatz antimykotischer Substanzen im Zentrum dieser Arbeit. Eine anschließende molekulare Typisierung sollte Aufschluß über eventuell lokal vorherrschende Genotypen, bzw. über das Vorliegen eines geographischen Verteilungsmusters bringen. Schließlich sollten die Ergebnisse der Erhebung eine Grundlage zur Entwicklung einheitlicher Präventions- bzw. Therapiestandards schaffen.

Den Hintergrund zu dieser Erhebung bildete die zwischen 1998 und 1999 durchgeführte ESPED-Studie (Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland) {64}, in welcher die Epidemiologie systemischer neonataler Pilzinfektionen in Deutschland innerhalb dieses Zeitraumes beschrieben wurde {142}. Anhand standardisierter Erhebungsbögen wurden alle Patientenfälle hinsichtlich Morbidität, Mortalität und angewandter antimykotischer Therapieschemata analysiert. Als Ergebnisse wurden auch in dieser Arbeit zuvor teilweise genannte Risikofaktoren zur Entstehung von Pilzinfektionen gefunden: Unter anderem wurden Faktoren wie niedriges Geburtsgewicht, geringes Gestationsalter oder die Verabreichung von Lipidemulsionen genannt. Der am häufigsten isolierte Pilz erwies sich mit 67% als *C. albicans*, neben 23,3% non-*albicans Candida*-Isolaten. Ebenso wurden verschiedene Parameter darauf geprüft, ob sie zur sicheren Identifikation von systemischen Pilzinfektionen einzusetzen seien. Letztlich erwies sich nur der Parameter „Thrombozythopenie“ als signifikant {52,64}. Allerdings wurden auch in dieser Arbeit keine epidemiologischen Daten zur Kolonisationsrate mit Pilzen bei Risikofrühgeborenen in Deutschland erhoben.

In mehreren Arbeiten mit verschiedenen Studiendesigns standen bisher oft Untersuchungen zur Ätiologie oder Epidemiologie von *Candida*-Infektionen bei Frühgeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht im Vordergrund. Hierzu konträr beschränkten sich andere Studien in vielen Fällen allein auf molekularbiologische Untersuchungen, teilweise noch in Kombination mit Testung der antimykotischen Empfindlichkeit, der *Candida*-Isolate. So untersuchten beispielsweise Ruiz-Diez et al. {65} 36 Isolate von neun Frühgeborenen, die im Zusammenhang mit Langzeitbesiedelung und Katheter-assoziierten Infektionen standen, mittels molekularbiologischen Verfahren auf ihre Verwandtschaft. In einigen Fällen wurden auch epidemiologische und molekularbiologische Methoden kombiniert, wie zum Beispiel bei Krcmery et al. {66}, die Untersuchungen zur Ätiologie, antimykotischen Empfindlichkeit, Risikofaktoren und „Outcome“ von Fungämien kombinierten. Ein Mangel vieler Studien liegt in der geringen Patientenzahl. Zwar ist aufgrund von Fertilitätsbehandlungen ein Anstieg bei Mehrlingsgeburten, und aufgrund der modernen Intensivmedizin ein Anstieg der Frühgeborenen mit einem geringen Geburtsgewicht zu verzeichnen, allerdings stellen diese immer noch ein relativ kleines Patientenkollektiv dar. Diese Arbeit soll als Kombination von epidemiologischen und molekularbiologischen Erhebungen, anhand eines repräsentativen Patientenkollektivs, Lücken versuchen zu füllen, die hinsichtlich der Kolonisations- und Infektionsraten, Risikofaktoren,

antimykotischer Empfindlichkeitstestungen und genotypischer Aufschlüsselung bestehen.

### Biologie

Durch *Candida*-Spezies hervorgerufene Infektionen werden allgemein als *Candidiasis*, *Candidose* oder *Candida*-Mykosen bezeichnet. Je nach befallenem Organsystem kann es zum Beispiel zu einer Vaginal- oder Urogenital-*Candidiasis* kommen. *C. albicans* ist eine dimorphe Hefe. Die Blastosporen führen zu typischen Sprossungen von Hefezellen, über welche die Adhäsion an epitheliale Barrieren bewirkt wird. Pseudohyphen hingegen, eine Art Pseudomyzel, sind meistens bei invasiven Infektionen des tiefen Gewebes zu finden. Aufgrund dieser Lebensformen können *Candida*-Spezies als Verursacher von oberflächlichen, tiefen und disseminierten Infektionen auftreten {29}. *C. albicans*-Stämme sind diploide und heterozygote Organismen, die keine Plasmide besitzen. Trotz des Verlustes der sexuellen Fortpflanzung wird durch mitotische Rekombinationen, Rearrangements auf Chromosomenebene und Mutationen eine hohe phänotypische Variabilität erzeugt, die sich in Unterschieden in der Koloniemorphologie, der Zellhülle, der oberflächlichen Permeabilität und der antimykotischen Empfindlichkeit äußert {10}. Nur *C. albicans*, *C. stellatoidea* und *C. dubliniensis* besitzen unter halbaeroben Bedingungen die Fähigkeit Chlamydosporen, Sprosszellen mit einer widerstandsfähigen Zellwand, zu bilden. Lediglich in Ausnahmefällen wurde dies auch bei anderen *Candida*-Spezies beobachtet {30}.

### Risikofaktoren der Pilzinfektionen bei Frühgeborenen

Durch zahlreiche Studien wurde in den letzten Jahren versucht, unterschiedliche Risikofaktoren und Mechanismen bei der Entstehung von *Candida*-Infektionen zu erforschen, um die Überlebenschancen mit effektiven Therapien oder Prophylaxen zu verbessern. Hierbei stehen vor allem Probleme, die aufgrund der Frühgeburtlichkeit der Patienten eine Rolle spielen, im Fokus. Mit sinkendem Gestationsalter und Geburtsgewicht haben Frühgeborene ein erhöhtes Risiko, an einer systemischen Pilzinfektion zu erkranken {14,23}. Ein großes Problem stellen hier die unreifen Organsysteme dar, die zu einer Vielzahl von akuten und chronischen Erkrankungen führen können {31}. Die unvollkommene anatomische Hautbarriere bietet nur einen



geringen Widerstand für Hefepilze, weshalb die Entstehung einer Dermatitis oder die Einwanderung in die Blutbahn {32,51} begünstigt wird. Durch den zunehmenden Wasserverlust steigt zudem das Infektionsrisiko zusätzlich an {33}. In einer Studie von Moro et al. {34} traten acht Fälle einer systemischen *Candidiasis* bei Frühgeborenen, die alle parenteral ernährt wurden, auf. Bei allen enteral ernährten Patienten hingegen trat in keinem Fall eine systemische Infektion auf. Neben der Lungenunreife (Surfactant wird erst ab der 35. SSW in ausreichender Menge produziert) mit einer daraus resultierenden Langzeit-Intubation und einem unzureichend entwickelten und funktionsuntüchtigen Gastrointestinaltrakt (verbunden mit einer chronischen Malnutrition {33} und der Gefahr einer nekrotisierenden Enterokolitis) begünstigen auch eine angeborene Immundefizienz (verminderte T-Zell-/ Neutrophilen- u. Granulozytenzahl, bzw. Funktionsminderung derselben), Lungenmakrophagen mit verminderter Anti-*Candida*-Aktivität, HIV, septische Granulomatose oder ein langer Krankenhausaufenthalt, {7,35} die Entstehung von *Candida*-Infektionen. Des Weiteren wurden in diesem Zusammenhang als weitere Risikofaktoren die Breitspektrum-Antibiotika-Behandlung, parenterale Steroid-Therapie, ein APGAR-Index < 5, Verabreichung von H<sub>2</sub>-Rezeptor-Blocker, DIC (disseminierte intravasale Coagulopathie), generell Schocksituationen, eine Hospitalisationsdauer > 7 Tage auf einer Intensivstation, multiple Organfunktionsstörungen, Verwendung von Inkubatoren und das Vorhandensein von intravenösen peripheren oder zentralvenösen Zugängen häufig genannt {6,7,8,18,34,36,37,38,39,40,41,42,45,46,47,48}. Unreife Frühgeborene leiden vermehrt unter Apnoen, ebenso an Hypothermie und Hypoglykämie, und es kann zur Entwicklung einer CLD (chronic lung disease) kommen. Außerdem besteht die Gefahr einer Frühgeborenen-Retinopathie und Taubheit, der psychomotorischen Retardierung und von neurologischen Schäden {31}. Zusätzlich kann bei einer Vaginalgeburt der Geburtskanal mit Keimen besiedelt sein, die sowohl für Früh-, als auch für Termingeborene ein erhöhtes Risiko für eine spätere Erkrankung darstellt {3,7}. Mit diesen möglichen Komplikationen und Folgeerkrankungen sehen sich die noch nicht immunkompetenten Frühgeborenen und immunsupprimierten Patienten konfrontiert, und tragen zu einer Förderung der Infektionsdisposition bei.

### Manifestationen von Candida-Infektionen bei Frühgeborenen

Drei wichtige Syndrome stehen hier im Vordergrund: Die kongenitale *Candidiasis*, katheter-assoziierte Fungämie und die systemische *Candidiasis* mit multiplen

Organbeteiligungen bei Frühgeborenen {3}, auf welcher unser Hauptaugenmerk liegt. Beide zuletzt genannten Manifestationen sind Vertreter nosokomialer bzw. horizontaler Infektionen. Die systemische *Candidiasis* bei Frühgeborenen weist die höchsten Zahlen für Morbidität und Mortalität auf {43,44}. Die Studie von Baley et al. {43} befasste sich gezielt mit der Besiedelung durch pilzliche Erreger bei Frühgeborenen und dem Risiko im Verlauf eine systemische Pilzinfektion zu entwickeln. Generell rufen Infektionen mit *Candida*-Spezies die unterschiedlichsten Manifestationen hervor. Neben den allgemeinen Syndromen, die durch *Candida*-Spezies verursacht werden, gibt es zahlreiche organspezifische Manifestationen und Erkrankungen. Diese stehen typischerweise im Zusammenhang mit einer Vielzahl von prädisponierenden Faktoren {29}. Mittlerweile wurde in zahlreichen Studien, allen voran die NEMIS-Studie (National epidemiology of mycoses survey) von Rangel-Frausto et al. {18}, eine große Anzahl dieser möglichen Risikofaktoren identifiziert, auf welche ausführlichst im vorangegangenen Kapitel eingegangen wurde. Lokal manifestieren sich *Candida*-Infektionen in Form von schweren Dermatitis um den Nabel oder um die Eintrittsstelle des intravasalen Katheters. Ebenso haben viele unreife Frühgeborene einen Mundsoor {57}. Die *Candida*-Dermatitis {49,50}, als invasive Pilz-Dermatitis tritt bei 5,9% auf, und äußert sich in Form von erosiven krustigen Läsionen. Sie ist mit einer hohen Rate an darauffolgenden systemischen Pilzinfektionen verbunden und oftmals mit einer Vaginalgeburts, Kortikosteroidtherapie oder einer Hyperglykämie assoziiert {49}. Einen schwerwiegenden Verlauf stellt die kongenitale *Candidiasis* dar, die innerhalb von Stunden nach der Geburt auftritt, und auf eine intrauterine Exposition der Frühgeborenen mit *Candida*-Spezies der vaginal besiedelten Mutter zurückzuführen ist {29}. Laut Saiman et al. {14} stellt die Katheter-assoziierte Fungämie die häufigste Manifestation mit *Candida*-Spezies dar. Sie bestätigt aber auch das Auftreten von Meningitis, Nieren-, Milz- und Leberabszessen, Endophthalmitis, Osteomyelitis und invasiver Dermatitis. Die Fungämie tritt meist im mittleren Alter von 30 Tagen auf und äußert sich in positiven Blutkulturen, ein Organbefall hingegen besteht nur selten. Therapeutisch stehen die Entfernung der Katheter und eine Behandlung mit Antimykotika, z.B. Amphotericin B im Vordergrund {29}. Im Gegensatz hierzu ist bei der systemischen *Candidiasis*, einer Sepsis entsprechend, der Organbefall obligat {29}. Weitere beschriebene Manifestationen systemischer Pilzinfektionen sind Urogenitaltrakt-Infektionen {20}, Endophthalmitiden {52} und Retinopathien {53}. Die Symptome einer systemischen *Candida*-Infektion sind größtenteils sehr unspezifisch und ähneln oft denen einer bakteriellen Infektion {52}. In 70% der Fälle imponiert die

Verschlechterung der Atmung bis hin zur Apnoe {18,35,40,52,54,55,56}. Weiterhin fallen die Temperaturinstabilität, geblähtes Abdomen, Carbohydrat-Intoleranz, und Lethargie der Frühgeborenen auf {35,40,55,56}. Ebenso kann eine Thrombozytopenie auftreten {52}.

### Übertragungswege

Die Möglichkeit des Erwerbs verschiedener pilzlicher Erreger kann über zwei Wege erfolgen: Überträgt eine besiedelte Mutter {58} ihren Keim auf ihr Kind spricht man von einer vertikalen Übertragung, erfolgt die Besiedlung über die Umwelt, am häufigsten nosokomial im Krankenhaus, z.B. über die Hände von Schwestern und Ärzten, ist von einer horizontalen Übertragung die Rede {52,57}. Ebenso spricht man hier von einer nosokomialen bzw. exogenen Infektion oder einer Kreuzkontamination, welche z.B. mittels eines Vektors, wie Hände des Personals {18} oder der Eltern, oder unbelebte Objekte erfolgt {7,21,57,59}. Andere Möglichkeiten der horizontalen Transmission stehen im Zusammenhang mit zentralen Venenkathetern, endotrachealen Tuben {38,60,61}, kontaminierten i.v.-Infusionen {42}, parenteraler Ernährung {34,38,42} und Augenlösungen {62}. Ebenso können kontaminierte Hyperalimentationlösungen, flüssiges Glycerin (Suppositorien) oder die intravasale Druckmessung als gemeinsame Quelle dienen, wobei dies eher seltener der Fall ist {7,37}. Allerdings kann die Infektion auch endogener Herkunft sein, da einige *Candida*-Spezies auch natürlich im Gastrointestinaltrakt vorkommen und bei schlechter Abwehrlage des Patienten als pathogene Keime fungieren {52}. Faix et al. {63} sehen die vertikale Transmission als häufigsten Modus des Erwerbs von *C. albicans* an und bemerken, dass hieraus meist eine Langzeitbesiedlung mit diesem Keim resultiert.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Studiendurchführung**

- a. Zur Durchführung der geplanten bundesweiten Studie zur Kolonisation mit Pilzen bei Risikofrühgeborenen mit einem Geburtsgewicht  $\leq 1500\text{g}$  und einem Lebensalter  $\leq 28$  Tagen wurde ein Studienprotokoll mit Formblättern (1-4),

Einverständniserklärung der Eltern und einer Elterninformation (s. Anlage) entworfen. Sämtliche Unterlagen wurden der Ethikkommission der Universität zur Beurteilung vorgelegt. Die Studienzentrale wurde unter der Leitung von PD Dr. med. Frank-Michael C. Müller in der Universitäts-Kinderklinik der Julius-Maximilian-Universität Würzburg, Josef-Schneider-Str. 2, in 97080 Würzburg eingerichtet. Die Speziesidentifikation und -differenzierung wurde freundlicherweise durch das Institut für Hygiene und Mikrobiologie unter Leitung von Frau PD Dr. M. Abele-Horn und Herrn Prof. Dr. M. Frosch durchgeführt.

- b. Zunächst wurden Kinderkliniken und neonatologische Zentren im gesamten Bundesgebiet angeschrieben, um über den Studienablauf und -ziele zu informieren. Im Anschreiben enthalten war ein Fragebogen über allgemeine Angaben zur Klinik (Betreuung von intensivpflichtigen Früh-/ Neugeborenen, Bettenanzahl), Angaben zur prophylaktischen Antimykotika-Gabe und über die Teilnahme an der Studie (siehe Anhang).
- c. Nach Erhalt des ausgefüllten Fragebogens, in welchem die Teilnahme an der Studie bekundet wurde, erfolgte die Übersendung der zur Studiendurchführung benötigten Unterlagen. Diese setzten sich zusammen aus einem Anschreiben mit allgemeinen Hinweisen zur Durchführung am Stichtag (29.05.2001), Prüfplan (Einschlusskriterien, genauer Studienablauf), Elterninformation, Einverständniserklärung, Formblätter 1-4, Befürwortung der Studie durch die Ethikkommission.
- d. Um eine möglichst hohe Rücklaufquote zu erhalten, wurden alle teilnehmenden Kliniken eine Woche, bzw. tags zuvor erneut an den Stichtag per Fax erinnert.
- e. Am festgesetzten Stichtag sollten bei allen Patienten, die die Studienkriterien (Lebensalter  $\leq$  28 Tage, Geburtsgewicht  $\leq$  1500g) erfüllten, Abstriche entnommen werden (rektal und Rachen, bei beatmeten Patienten: Trachealsekret). Die Proben wurden von der jeweiligen Klinik mit einer individuellen Patientenummer versehen (z.B. Patienteninitialen, Nummerierung, Klinikinitialen), welche unbedingt im Formblatt 1 (Patientenregister) vermerkt wurden, um eine spätere Identifizierung für das Follow-up zu ermöglichen. Das Formblatt 1 verblieb bei der jeweils einsendenden Klinik. Im Formblatt 2 (Patientendaten) wurden alle Angaben (Geburtstag, Geburtsmodus, bisherige Medikation, etc.) individuell zu jedem im Formblatt 1 registrierten Patienten dokumentiert. Noch am selben Tag wurden die Proben mit dem Formblatt 2 an die zentrale Studienleitung versandt.

- f. Nach Ankunft der Proben in der Studienzentrale wurden diese sofort mit einer Studiennummer versehen, um die individuelle Zuordnung der Proben zum Patient zu gewährleisten. Diese wurde zusammen mit einem Kürzel für den Abstrichort der Probe (a = anal, r = Rachen, t = Trachealsekret) auf dem mitgeschickten Formblatt 2 zum jeweiligen Patienten notiert. Die Vergabe der Studiennummer erfolgte für jedes Abstrichröhrchen, so dass ein Patient mindestens zwei Studiennummern erhielt (z.B. Studiennummer 20 a/ 21 r). Die Proben verblieben zur Speziesidentifikation im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (Direktor: Prof. Dr. M. Frosch). Die Auswertung der Daten des Formblatts 2 erfolgte über die Eingabe in eine Microsoft Access Datenbank.
- g. Nach der Speziesidentifikation wurden die Proben im Molekularbiologischen Labor der Universitätskinderklinik auf ihre Antimykotika-Empfindlichkeit getestet und die Isolate molekularbiologisch typisiert.
- h. Nach 60 Tagen (30.7.2001) wurden die Patientenakten bezüglich eines „Outcome“ und Auftreten einer systemischen Pilzinfektion untersucht. Hierzu erfolgte eine nochmalige Versendung der Formblätter 3 und 4 („Follow up“, Bogen zur Erfassung systemischer Pilzinfektionen) per Fax.
- i. Am Tag des Follow-up wurden die Daten, der im Formblatt 1 (Patientenregister) vermerkten Patienten, im Formblatt 3 notiert (verstorben, entlassen, noch hospitalisiert). Ebenso war das Auftreten einer systemischen Pilzinfektion zu vermerken. Bei Diagnose derselben war das Formblatt 4 zu vervollständigen (Patientennummer, isolierte Pilzspezies, Informationen über andere Kulturen, medikamentöse Behandlung, etc.). Beide Formblätter wurden an die zentrale Studienleitung versandt.
- j. Die Datenbank wurde um die Informationen aus Formblatt 3 und 4, die den entsprechenden Patienten zugeordnet wurde, erweitert.
- k. Fehlende oder ungenaue Angaben auf den Formblättern wurden jeweils durch telefonische Nachfrage ergänzt.
- l. Nach der Speziesidentifikation wurden die teilnehmenden Kliniken per Fax über die Kolonisation ihrer Patienten informiert.
- m. Es erfolgte eine Auswertung der, in der umfassenden Datenbank, gespeicherten Daten. Anhand wichtiger Fragestellungen wurden Selektionen in der Datenbank durchgeführt und die Ergebnisse graphisch in Excel-Diagrammen und –Tabellen dargestellt.

- n. Nach Auswertung aller statistischen Daten, Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration und Beendigung der molekularen Typisierung wurden alle teilnehmenden Kliniken über Resistenzdaten und Ergebnisse informiert.
- o. Die Ergebnisse wurden auf Tagungen der wissenschaftlichen Fachgesellschaften vorgestellt und diskutiert.

## **2.2. Material**

### Stämme

Alle klinischen Patientenisolat stammen aus Abstrichen bzw. Sekreten, die von den teilnehmenden Kliniken am Stichtag mit einem Abstrichtupfer aus den vorgegebenen Regionen (Anus, Rachen, Trachealsekret) entnommen wurden. Die Speziesidentifizierung der Stämme wurde durch das Institut für Hygiene vorgenommen. Nach Anzucht auf Sabouraud-Agar erfolgte die Differenzierung mittels bunter Reihe und Morphologie auf Chromagar. Bei nicht eindeutiger Zuordnung zu einer Spezies erfolgte eine Unterscheidung mittels einer biochemischen Reihe, dem „Analytischen Profil Index“ (API-System). Anhand biochemischer Reaktionen wird dem Isolat ein Profil zugeordnet, welches mit standardisierten und im „Analytischen Profil Index“ festgelegten Profilen verglichen wird.

Als Kontrollstämme für die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration und bei der molekularen Typisierung dienten Stämme der American Type and Tissue Collection (ATTC) und des Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS):

<b>Stämme</b>	<b>Anzahl</b>
ATTC 90028 <i>C. albicans</i>	1
ATTC 22013 <i>C. parapsilosis</i>	1
CBS 5901 <i>C. lusitaniae</i>	1
CBS 1909 <i>C. guilliermondii</i>	1
ATTC 90030 <i>C. glabrata</i>	1
ATTC 6258 <i>C. krusei</i>	1

Tabelle 1: Kontrollstämme mit Herkunft und Identifikationsnummer

## **2.3. Methoden**

### **2.3.1. *Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)***

Um die Isolate auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Antimykotika zu testen, wurde ein leicht modifiziertes Mikrodilutionsverfahren nach dem NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards {67} Standard angewandt. Abweichend zur NCCLS-Norm wurde High Resolution-Medium (HR) verwendet. Zu einer antimykotischen Verdünnungsreihe wird eine Hefesuspension mit definierter Einsaat gegeben. Nach Inkubation kann die minimale Hemmkonzentration ermittelt werden.

#### **Herstellung der Medikamentenplatten**

Zunächst erfolgt die Herstellung der Mikrotiterplatten mit den entsprechenden Antimykotika. Für jedes der *Candida*-Isolate wurde eine MHK für Amphotericin B (SIGMA, Deisenhofen), 5-Fluorocytosin (SIGMA, Deisenhofen), Fluconazol (Pfizer, Illertissen) und Itraconazol (Janssen, Beerse, Belgien) bestimmt. Hierzu wurden zu jedem Medikament Verdünnungsreihen mit bestimmten Konzentrationen angelegt: Amphotericin B 0,03–16 µg/ml, 5-Fluorocytosin 0,03-32 µg/ml, Fluconazol 0,125–128 µg/ml, Itraconazol 0,03–4 µg/ml. Dabei erfolgte eine entsprechende Verdünnung mittels HR-Medium. Zur Herstellung der Medikamentenplatte wurden je 100µl der verschiedenen Konzentrationen in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiter-Platte pipettiert. Als Wachstumskontrolle (K) dienten je 100µl HR-Medium. In die Reihen „1-7“ wurden die Suspensionen der zu testenden *Candida*-Isolate pipettiert. Bei jeder Testung musste ein Kontrollstamm in der Reihe „8“ mitgeführt werden. Beispiel einer 96-Well-Mikrotiter-Platte für das Antimykotikum Fluconazol:

	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	K
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												

Abb. 1: 96-Well-Mikrotiter-Platte

Die Medikamentenplatten wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für höchstens acht Monate gelagert.

### Ansatz des HR-Medium

Um die Hefekolonien von den Agarplatten in eine Suspension zu überführen, wurde *HR-Medium-fertig* benötigt. Dies setzte sich aus gleichen Anteilen von HR-Medium und Phosphatpuffer zusammen.

Für das HR-Medium wurde High-Resolution-Medium von Oxoid (Wesel) verwendet. Zunächst wurden 16,87g HR-Pulversubstanz und 10 g Glucose in 450 ml destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Nach Zugabe von 1 g Asparagin, welches zuvor in 50 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  gelöst wurde, erfolgte die Sterilisation durch einen Vakuumfilter.

Die Inhaltsstoffe für den Phosphat-Puffer wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. Für den Puffer I wurden 35,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  in einem Liter dest. Wasser und für den Puffer II 27,22 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in einem Liter dest. Wasser gelöst. Dann wurden 720 ml der Puffer I – Lösung und 280 ml der Puffer II – Lösung vermengt. Anschließend wurde die Lösung gemischt und autoklaviert.

Um nun *HR-Medium-fertig* zu erhalten, wurden jeweils das HR-Medium und der Phosphatpuffer zu gleichen Teilen miteinander vermischt.



### Durchführung der in vitro Antimykotika-Empfindlichkeitsprüfung

Die Hefen wurden auf Sabouraud-Agar überimpft und bei 37° für 48 h inkubiert. Für die Inokulation wurde je eine einzelne Hefekolonie in 1 ml HR-Medium gelöst und verdünnt. Hierzu wurde mittels einer geeichten Thoma-Zählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen) und einem zugehörigen Deckgläschen unter dem Mikroskop die ungefähre Koloniezahl/ml bestimmt und dann entsprechend mit HR-Medium auf Konzentrationen zwischen 1000 – 3000 CFU/ ml verdünnt.

Je 100 µl der Hefelösung wurden in die Vertiefungen der 96-Well-Mikrotiter-Platte des jeweiligen Medikaments pipettiert. Hierdurch wurde erneut eine 1:1 Verdünnung und somit eine Konzentration der Hefen von 500 – 1500 CFU/ ml erreicht.

Nach der Inokulation wurden die beimpften Medikamentenplatten erneut bei 37° für 48h inkubiert.

Am Ende der Inkubationszeit erfolgte nach fünfminütigem Schütteln der Medikamentenplatte (dieser Schritt ist zum vollständigen Lösen der Hefen nötig) eine Auswertung der Proben durch ein Photometer (Photometer: Tecan Sunrise, TECAN Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 540 nm.

Für die Medikamente 5-Fluorocytosin, Fluconazol, und Itraconazol erfolgte die MHK-Bestimmung photometrisch. Hiernach wurde der Wert, bei dem 50 % des Wachstums gehemmt wurde, als MHK-Wert ermittelt. Das bedeutet, dass die Extinktion der zu messenden Probe gegenüber der Kontrollextinktion weniger als 50 % betrug. Wohingegen bei Amphotericin B eine visuelle MHK-Wert-Bestimmung erfolgte. Hierzu wurde der Wert bestimmt, bei dem visuell kein Wachstum der Hefe mehr zu erkennen war.

Um den endgültigen MHK-Wert festzulegen erfolgte eine Zweitbestimmung. Wichen die ermittelten Werte nicht mehr als eine Konzentrationsstufe voneinander ab, wurde entweder dieser eine Wert (bei übereinstimmenden Werten) oder der höhere (bei zwei unterschiedlichen Werten) festgesetzt. Lagen die Werte bei der Drittbestimmung weiter als eine Konzentrationsstufe voneinander entfernt wurde eine weitere Kontrollbestimmung der MHK notwendig.

### 2.3.2. Auswertung der MHK-Werte

Medikament	empfindlich	empfindlich - dosisabhängig	intermediär	resistent
5-Fluorocytosin	≤4	-	8-16	≥32
Fluconazol	≤8	16-32	-	≥64
Amphotericin B*	≤1	-	-	>1
Itraconazol	≤0,12	0,25-0,5	-	≥1

Tabelle 2: Einteilung des Empfindlichkeitsverhaltens

\* bisher keine Breakpoints durch die NCCLS festgelegt

Aufgrund der MHK-Werte konnte den Isolaten ein Empfindlichkeitsverhalten zugeordnet werden. Je nach MHK-Wert konnte eine Einteilung in die Gruppen „empfindlich“, „empfindlich-dosisabhängig“, „intermediär“ und „resistent“ erfolgen. Im Ergebnisteil wurden die allgemeinen MHK-Werte zu „MHK<sub>50%</sub>“ (50% der Isolate liegen über bzw. unter diesem MHK-Wert), „MHK<sub>90%</sub>“ (90% der pilzlichen Erreger liegen unterhalb dieses MHK-Werts, nur 10% liegen höher), „range“ und „Mittelwert“ zusammengefasst. Die Resistenzdaten verschiedener Stämme wurden separat zusammengestellt.

## Molekulare Typisierung

### 2.3.3. Allgemein

In der Vergangenheit wurde anhand molekularbiologischer Methoden versucht die genotypischen Eigenschaften, zunächst der Spezies *C. albicans*, später auch der non-*albicans*-Spezies, zu entschlüsseln. Unterschiedlichste Verfahren kamen zum Einsatz, denen je nach Methode, eine hohe oder geringe Diskriminierungspotenz zwischen den einzelnen Spezies bzw. Isolaten zugeschrieben werden konnte. Voraussetzungen für den Einsatz dieser Methoden sahen Reiss et al. [13] darin, dass derartige Techniken sensitiv genug sein müssten, um zwischen epidemiologisch unverwandten Stämmen zu unterscheiden, generell für jeden Stamm der jeweiligen Spezies anwendbar sein sollten und zuletzt einfach in der Anwendung gut reproduzierbar, schnell und kostengünstig sein müssten [13,137,138]. In der heutigen Zeit werden diese

Typisierungsverfahren neben der Ermittlung der genotypischen Charakteristika eines Isolats, auch zur Lösung epidemiologischer Fragestellungen bei *Candida*-Infektionen eingesetzt {65,68,69,70}. So verwendeten Faix et al. {63} das Southern-Blot-Verfahren mit der *Candida*-spezifischen Sonde 27A und ein enzymatisches Verfahren mit *EcoRI* and *XbaI* zur Analyse der genomischen DNA von fünf Frühgeborenen, die während eines sechswöchigen Aufenthalts auf einer Frühgeborenenintensivstation, an einer systemischen Infektion mit *C. albicans* erkrankten. Zwar bescheinigte die Restriktionsfragmentanalyse den Isolaten hohe Ähnlichkeiten, die Hybridisierungsergebnisse zeigten jedoch, dass alle Stämme genetisch unterschiedlich waren. Vaudry et al. {47} wiesen mittels Restriktionsenzymen und Proteinelektrophorese bei individuellen Patientenisolaten identische DNA-Profile nach, woraus sie anhand der räumlichen und zeitlichen Zusammenhänge der Frühgeborenen auf der Neugeborenenintensivstation auf eine Kreuzinfektion schlossen. Reef et al. setzten zur Erforschung des Erwerbs einer *Candida*-Besiedelung bei Neugeborenen in einer prospektiven Studie das Southern-Blot-Verfahren mit der *Candida*-spezifischen Sonde CARE-2 ein und kamen zu dem Ergebnis, dass eine nosokomiale Transmission der prädominante Modus zu sein scheint {57}. Voss et al. {71} setzten zur genotypischen Typisierung der Isolate eines *C. albicans*-Outbreaks (innerhalb einer vierwöchigen Periode) neben dem Elektrokaryotyping auch die Analyse mit Restriktionsendonukleasen, wie *BssHII* und *SfiI*, ein. Neben den Isolaten der sechs sicheren *C.albicans*-Infektionen wurden auch Proben an den Händen von fünf Krankenschwestern und dem Mantel eines Pflegers isoliert. Durch die DNA-Analyse ergab sich, dass drei der Patienten mit demselben *C. albicans*-Stamm infiziert waren, und ein Patient mit dem Stamm des Pflegers schon vor dem Ausbruch der Infektion besiedelt war. Anhand der Ergebnisse stellten sie fest, dass die Diskriminierungspotenz der Restriktionsendonuklease *SfiI* höher zu bewerten sei, als die alleinige Anwendung der Karyotypisierung. Dennoch lag in der Kombination der verschiedenen Methoden die höchste diskriminatorische Fähigkeit. Mendling et al. {72} erforschten mittels des Einzelprimers T3B die Unterschiede in den DNA-Profilen zwischen *C. albicans* und *C. glabrata* bei Frauen, die an rezidivierenden vaginalen *Candidosen* litten. Anhand der Typisierungsergebnisse konnten neue Erkenntnisse hinsichtlich der Notwendigkeit einer Partnerbehandlung mit dem Ziel einer Verbesserung des klinischen „Outcomes“ einer vaginalen Mykose gewonnen werden. Walsh et al. {73} untersuchten Einzelstrang-Polymorphismen (SSCP, single-strand conformational polymorphism), um zwischen Pilz-Spezies und -Genera zu

differenzieren. Anhand geringer, aber phylogenetisch wichtiger, Basenpaardifferenzen konnten medizinisch wichtige Pilz-Spezies, wie *Candida*- und *Aspergillus*-Spezies, *Cryptococcus neoformans* und *Rhizopus arrizus* unterschieden werden. Dennoch bleiben aufgrund des Mangels an schnell verfügbaren und reproduzierbaren Typisierungsmethoden oftmals epidemiologische Hintergründe, wie z.B. die Identifikation einer Erregerquelle {34}, unaufgeklärt.

Neben den moderneren molekularbiologischen Typisierungsmethoden existieren schon seit langem hilfreiche Biotypisierungsmethoden mittels welcher *Candida*-Spezies durch Unterschiede in der Koloniemorphologie, der Chlamydosporenbildung, im Kohlenstoff-, Stickstoff-Auxonogramm, dem Fermentationsvermögen, der Wachstumskinetik, der Adhärenzfähigkeit, der Proteolyse, der Enzymprofile, der Carbohydrat-Assimilation und der Antimykotika-Empfindlichkeit in die verschiedenen Typen und Subtypen gegliedert wurden {74,75,76,77,78,79}. Derartige Biotypisierungen wurden allmählich mit molekularbiologischen Methoden kombiniert und im Laufe der Zeit ersetzt. So kombinierten Pfaller et al. {80} in ihrer Studie Biotyping und DNA-Fingerprinting, um 68 *C. albicans*-Isolate in Typen und Subtypen zu gliedern. Ziel der Arbeit war es, die genaue Anzahl der Genotypen mit der jeweiligen Methode oder der Kombination der Verfahren festzulegen. Hierbei konnte der Biotypisierung eine höhere Diskriminierungsfähigkeit, gegenüber der molekularbiologischen Methode zugesprochen werden. Die höchste Aussagekraft erlangte ebenfalls hier die Kombination der Verfahren. Hunter {74} untersuchte in seiner Arbeit verschiedene Typing-Methoden, z.B. Serotyping, Morphotyping, Resistotyping, Biotyping, „Killer-yeast“-Typing und elektrophoretische Methoden (Immunoblotting, Isoenzym-Analyse, RFLP-PCR, Karyotyping und DNA-Sonden) hinsichtlich ihrer Typisierungsfähigkeit, Reproduzierbarkeit und Diskriminierungsfähigkeit. Reiss et al. {13} befanden aber keine dieser Biotypisierungs-Methoden als ideal, da sie oft gering reproduzierbar, übermäßig unhandlich seien und darüber hinaus nur über eine begrenzte Diskriminierungsfähigkeit verfügen würden.

#### **2.3.4. DNA-Extraktion**

Um Versuche hinsichtlich der molekulargenetischen Verwandtschaft einzelner Pilzisolat durchzuführen zu können, musste als erster Schritt die DNA aus den Hefekolonien isoliert werden. Hierfür wurde die Extraktion mit Phenol-Chloroform-

Isoamylalkohol ausgewählt, da sie ein effektives Verfahren darstellt, um DNA von guter Qualität mit geringen Mitteln in ausreichender Konzentration zu isolieren.

Da die Struktur der Hefezelle neben der von uns benötigten DNA auch andere „unwichtige“ Bestandteile, wie Zellwände und – organellen oder Proteine enthält, ist es wichtig, diese durch mehrere Arbeitsschritte zu entfernen, um die DNA zu erhalten bzw. anzureichern. So wird durch den Wechsel von Zentrifugieren, zur Auftrennung löslicher und unlöslicher Zelltrümmer, Zugabe von Proteasen, zum Abbau der Proteine, Denaturierung und Ausfällen der Proteine mit Phenol, Behandlung mit Ribonuclease, zum Abbau von RNA, und durch Ausfällen mit Isopropanol und Ethanol, die Anreicherung der DNA bewirkt.

### Isolierung chromosomaler DNA (Phenol-Chloroform-Methode) {81}

Diese Methode zur Isolierung von DNA erforderte einige Arbeitsschritte. Zunächst stand das Ansetzen der Lösungen und Puffer im Vordergrund.

#### Anzucht der Stämme

Zur Anzucht wurden die Proben auf Sabouraud-Agar ausgestrichen und für mindestens vier Tage bei 30° C im Inkubator kultiviert.

#### Übernachtskulturen

Um eine noch größere Menge an DNA aus den Hefekolonien zu gewinnen, wurde eine mittelgroße Hefekolonie von der Agarplatte ausgewählt und mit 15 ml des Flüssignährmediums YPD (Yeast-Potato-Dextrose-Medium) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben vermischt. Danach wurde das Gemisch über Nacht in einem Schüttler bei 30° C inkubiert und hierdurch eine zusätzliche Anreicherung an Hefezellen erzielt.

#### Phenol-Chloroform-Extraktion {81}

Am nächsten Tag wurden die Übernachtskulturen in 50 ml Greinerröhrchen überführt und für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde das Zellmaterial in 1 ml 1 M Sorbitol suspendiert und in 2 ml Eppendorf-Caps überführt.

Dann erfolgte eine erneute Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm mit anschließendem Verwerfen des Überstandes. Nun wurde der Lyticase-Ansatz, bestehend aus 2 ml Lyse-Puffer, 40 ml 2-%-igem  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1 mg Lyticase (500 units/ml), unter einem Abzug hergestellt.

Die Proben wurden unter einem Abzug in jeweils 1 ml Lyticase-Ansatz suspendiert und anschließend für 45 min bei 37° C inkubiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 800  $\mu$ l des zuvor angesetzten Proteinase-Ansatzes (bestehend aus 2 ml Proteinase-Puffer und 8 mg Proteinase K) gelöst und anschließend für 30 min im Heizblock bei 60° C inkubiert.

Die Phenol-Extraktion erfolgte wiederum unter einem Abzug. Dieser Schritt bestehend aus Vermengung mit dem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch, dem darauf folgendem Schütteln und Zentrifugieren sowie dem Abpipettieren der Oberphase ins nächste Cap wurde dreimal wiederholt.

Das Zellmaterial wurde jeweils mit 800  $\mu$ l, im nächsten Schritt nochmals mit 800  $\mu$ l und zuletzt mit 700  $\mu$ l der unteren Phase des Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs (25:24:1) versetzt und nach zweiminütigem Schütteln und anschließender einminütiger Zentrifugation in zwei Phasen aufgetrennt. Die obere Phase wurde in ein weiteres Cap abpipettiert und mit der entsprechenden Menge des Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs vermengt. Zuletzt erfolgte die Ausfällung mit 600  $\mu$ l eisgekühltem Isopropanol. Hinterher wurde die DNA durch fünfminütige Zentrifugation zu einem Pellet am Boden des Caps konzentriert und der Überstand abgekippt. Das Pellet wurde mit 600  $\mu$ l 70 %-igen Ethanol gewaschen und nach kurzem Antrocknen in 200  $\mu$ l TE-Puffer gelöst.

Nun erfolgte die RNA-Spaltung. Hierfür wurde zu jedem Cap 2  $\mu$ l des RNase-Ansatzes gegeben, das ganze vermischt und für 30 min bei 37° C inkubiert. Hieran schloss sich eine erneute Phenol-Extraktion, wie oben beschrieben, an. Diesmal wurde der Schritt nur zweimal, mit jeweils 200  $\mu$ l des Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs, wiederholt. Nach der Ausfällung mit 200  $\mu$ l eisgekühltem Isopropanol wurde auch hier, nach fünfminütiger Zentrifugation und anschließendem Abgießen des Überstandes, das entstandene DNA-Pellet mit diesmal 200  $\mu$ l 70 %-igen Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Proben wurden je nach Größe des DNA-Pellets mit einer geeigneten Menge an dH<sub>2</sub>O gelöst und bis zur Bestimmung der DNA-Konzentration bei -20° C gelagert.

## Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration wurde eine 1:100er Verdünnung der einzelnen Proben angefertigt, d.h. es wurden zunächst 396 µl dH<sub>2</sub>O in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap vorgelegt und anschließend 4 µl der eingefrorenen DNA hinzu gefügt. Von diesem Gemisch wurden 80 µl in eine Quarzküvette (Referenzwert: dH<sub>2</sub>O) pipettiert und die optische Dichte bei 260 und 280 nm mittels eines Photometers (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Ratio, deren Werte in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,2 liegen sollte.

### **2.3.5. Molekularbiologische Typisierung mittels RAPD-PCR**

Die RAPD-PCR (Random-Amplified-Polymorphic DNA) dient zur Vervielfältigung vorher undefinierter Abschnitte sehr geringer Mengen an DNA. Ein einzelner unspezifischer Primer der komplementär zur gesuchten Basenabfolge ist, dient als kurzes „Starter“-DNA-Molekül, und bindet am jeweiligen Ende des gesuchten DNA-Abschnitts. Mit Hilfe eines Enzyms, der Taq-Polymerase, erfolgt in einer PCR-Maschine der Vervielfältigungsprozess mit einer ungefähr 10<sup>6</sup>-fachen Kopienanzahl des gesuchten DNA-Abschnitts. Am Ende wird das PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Da DNA-Moleküle negativ geladen sind, kann eine Auftrennung im elektrischen Feld erfolgen. Große DNA-Moleküle können das Zuckermolekülnetz des Agarosegels nur langsamer passieren, als kleine. Mit Hilfe der Fluoreszenz von Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht.

#### RAPD-PCR (Random-Amplified-Polymerase-Detection) {82,83}

Zur genauen Differenzierung der einzelnen *Candida*-Spezies hat sich die RAPD-PCR nach Sullivan et al. als günstig erwiesen {82,83}. Hierfür wurde der Primer RPO2 (5'-GCGATCCCCA-3') ausgewählt {84}. Zur weiteren Differenzierung der *C. parapsilosis*-Stämme kam Primer RSD12 (5'-GCATATCAATAAGCGCAGGAAAAG-3') mit leicht veränderten PCR-Parametern nach Dassanayake et al. zum Einsatz {85}. Als Ansatz

wurde jeweils ein Reaktionsvolumen von 50 µl gewählt. Für eine Probe setzte sich dieses aus 31,5 µl dH<sub>2</sub>O, 5 µl 10x-PCR-Puffer (Qiagen, Hilden), 10 µl Q-Solution (Qiagen, Hilden), 1 µl Primer RPO<sub>2</sub> (MWG Biotech, Ebersberg), 0,5 µl Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden), 1 µl Trinucleotide (Gibco, Eggenstein) und 1 µl DNA zusammen. Alle Reagenzien (außer dH<sub>2</sub>O) wurden bei –20°C gelagert.

Der PCR-Puffer (10x) bestand aus Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 15 mM MgCl<sub>2</sub> bei pH 8,7. Die Trinucleotide (dNTP) wurden von ursprünglich 100mM auf 10mM verdünnt. Die Konzentration der Taq-Polymerase entsprach in der Ausgangskonzentration 5 units/ µl. Da aber nur 0,5 µl im Reaktionsansatz eingesetzt wurden, entsprach die Konzentration 2,5 units/ µl. Die Konzentration der eingesetzten DNA betrug 0,020 – 0,025 µg/µl. Die angegebenen Mengen der Reaktionspartner wurden in ein 0,5 ml Cap pipettiert und gemischt, wobei die Taq-Polymerase zuletzt eingesetzt wurde. Anschließend erfolgte die Amplifikation in einem Mastercycler Gradient (Fa. Eppendorf, Köln). Folgende PCR-Parameter wurden gewählt:

<b>Parameter</b>	<b>Primer RPO<sub>2</sub></b>	<b>Primer RSD12</b>
Initiale Denaturierung	10 min bei 95°C	
Denaturierung	1 min bei 95°C	30 s bei 94°C
Annealing	1 min bei 36°C	2 min bei 52 bzw. 57 °C
Proliferation	2 min bei 72 °C	2 min bei 72 °C
Anzahl Zyklen	30	50
nochmalige Proliferationsphase	10 min bei 72°C	15 min bei 72°C
Abkühlung	8°C	8°C

*Tabelle 3: PCR-Parameter der RAPD-PCR*

Nach Beendigung der 30 Amplifikationszyklen (RPO<sub>2</sub>), entsprechend den vorgegebenen Parametern, folgte eine nochmalige Proliferationsphase von 10 min bei 72°C. Bei Primer RSD12 wurden zunächst fünf Zyklen mit Denaturierung, Annealing bei 52°C und anschließender Proliferation durchgeführt. Im nächsten Schritt folgten 45 Zyklen mit einer auf 57°C erhöhten Annealing-Temperatur und einer 15-minütigen Proliferationsphase. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt jeweils auf 8°C abgekühlt. Die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts stellte den letzten Schritt dar.



### **2.3.6. Molekularbiologische Typisierung mittels IR-PCR**

Die IR-PCR (Inter-Repeat) stellt ein Verfahren dar, welches Elemente der RAPD-PCR und mikrosatellitäre Abschnitte der DNA miteinander kombiniert. Hierbei dienen Oligonukleotide, die komplementär zu mikrosatellitärer DNA (sich wiederholende kurze Sequenzen) sind, als Primer. Hierbei ist das Inter-Repeat-Verfahren dem der RAPD überlegen, weil hierbei mehr zu vervielfältigende Genloci pro Reaktion gefunden werden und gerade diese zur Hypervariabilität neigen.

#### IR-PCR (Inter-Repeat) {69}

Zur weiteren Differenzierung der einzelnen *Candida*-Isolate wurde die Inter-Repeat-PCR (IR-PCR) durchgeführt {69}. Hierfür wurden zwei Primer eingesetzt: Primer 1245 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3') und Primer 1246 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGATTAC-3') {86}. Als Ansatz wurde wieder ein Reaktionsvolumen von 50 µl gewählt. Dieses setzte sich für eine Probe aus 30,75 µl dH<sub>2</sub>O, 5 µl 10x-PCR-Puffer (Qiagen, Hilden), 10 µl Q-Solution (Qiagen, Hilden), 1 µl Primer 1245 (MWG Biotech, Ebersberg), 1 µl Primer 1246 (MWG Biotech, Ebersberg) 0,25 µl Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden), 1 µl Trinucleotide (Gibco, Eggenstein) und 1 µl DNA zusammen. Alle Reagenzien (außer dH<sub>2</sub>O) wurden bei -20°C gelagert.

Der PCR-Puffer (10x) bestand aus Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 15 mM MgCl<sub>2</sub> bei pH 8,7. Die Trinucleotide (dNTP) wurden von ursprünglich 100mM auf 10mM verdünnt. Die Konzentration der Taq-Polymerase entsprach in der Ausgangskonzentration 5 units/ µl. Da aber nur 0,25 µl im Reaktionsansatz eingesetzt wurden, entsprach die Konzentration 1,25 units/ µl. Die Konzentration der eingesetzten DNA betrug 0,020 – 0,025 µg/µl.

Die angegebenen Mengen der Reaktionspartner wurden in ein 0,5 ml Cap pipettiert und gemischt, wobei die Taq-Polymerase zuletzt eingesetzt wurde. Anschließend erfolgte die Amplifikation in einem Mastercycler Gradient (Fa. Eppendorf, Köln).

Folgende PCR-Parameter wurden gewählt:

<b>Parameter</b>	<b>Primer 1245</b>	<b>Primer 1246</b>
Initiale Denaturierung	5 min bei 95 °C	5 min bei 95 °C
Denaturierung	1 min bei 95 °C	1 min bei 95 °C
Annealing	1 min bei 25 °C	1 min bei 25 °C
Proliferation	2 min bei 74 °C	2 min bei 74 °C
Anzahl Zyklen	35	35
nochmalige Proliferationsphase	5 min bei 74 °C	5 min bei 74 °C
Abkühlung	8 °C	8 °C

*Tabelle 4: PCR-Parameter der IR-PCR*

Nach Beendigung der 35 Amplifikationszyklen, entsprechend nach den vorgegebenen Parametern, folgte eine erneute Proliferationsphase von 5 min bei 74 °C. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt auf 8 °C abgekühlt. Danach folgte die gelelektrophoretische Auftrennung. Die PCR-Produkte wurden beim RAPD-Verfahren auf einem 1%-igem, bei der IR-PCR auf einem 1,5%-igem Agarosegel aufgetrennt. Zur Hälfte der zuvor amplifizierten DNA wurden 6 µl Mass Loading Dye der Marke MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) gegeben. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine 1kB DNA-Ladder von MBI-Fermentas verwendet. Der Marker wurde in der ersten Geltasche aufgetragen, dann folgten die Proben und in der letzten Geltasche die Kontrollprobe. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte im 1xTAE-Puffer (enthält TRIS, Eisessig, EDTA pH 8,0, H<sub>2</sub>O) bei einer Laufzeit von 3 h und bei einer konstanten Spannung von 80 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für ungefähr 10 min in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend die DNA-Banden mit dem Geldoc 2000-System (Fa. Biorad, München) bei UV-Licht fotografiert und dokumentiert.

### **2.3.7. Southern-Hybridisierung**

Mit der Southern-Hybridisierung ist es möglich durch Anlagerung einer einzelsträngigen markierten DNA-Sonde, hier CARE-2-Sonde (*Candida-repetitives-Element-2*), eine dazu komplementäre Zielsequenz, die ebenfalls einzelsträngig sein muss, zum DNA-Doppelstrang zu ergänzen und somit ebenso zu markieren. Zunächst wird die DNA durch ein Restriktionsenzym in Fragmente geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt. Diese DNA-Einzelstränge werden durch Anlegen eines

Vakuums auf eine Nylon-Membran übertragen. Durch Zugabe der spezifischen Sonde erfolgt die Hybridisierung. Nach mehreren Waschschrinen können die gesuchten DNA-Fragmente mittels Photoreaktion dargestellt werden.

### Southern-Blotting

Die Southern-Hybridisierung wurde mit der für *Candida*-spezifischen Sonde CARE-2 (*Candida*-repetitiven-Elements-2) {87} durchgeführt. Sie stellt ein mittleres repetitives Element dar, welches aus *C. albicans*-Isolaten isoliert wurde. In Southern-Blots konnte beim Einsatz der CARE-2 ein hohes Maß an Variationen zwischen verschiedenen Stämmen mit einem Minimum von zehn bis 14 CARE-2-Kopien pro Stamm erzielt werden {87}. Voraussetzung für die Vielzahl der Arbeitsschritte war das Ansetzen von mehreren Lösungen und Waschpuffern.

### Herstellung der CARE-2-Sonde

Zur Herstellung des *Candida*-repetitiven-Elements-2 waren mehrere Arbeitsschritte nötig, welche der Herstellung eines Sequenzierungsprodukts bei einer PCR ähneln. Zunächst wurde ein Ansatz, bestehend aus zwei Primern, angefertigt: Primer CARE 2/1 (5'-CTCTAAACTGTGCTTGGTG-3') und Primer CARE 2/2 (5'-AATTTGCACTCATCGAGAGC-3'). Für den Ansatz wurde ein Reaktionsvolumen von 50 µl gewählt:

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Hersteller</b>
dH <sub>2</sub> O	44 µl	
Primer CARE 1/2	1 µl	Qiagen (Hilden)
Primer CARE 2/2	1 µl	Qiagen (Hilden)
Taq-Polymerase	1 µl	Qiagen (Hilden)
Trinucleotide	2 µl	Gibco (Eggenstein)
DNA-Menge	1 µl	

*Tabelle 5: CARE-2-Ansatz*

Die Trinucleotide (dNTP) wurden von ursprünglich 100mM auf 5mM verdünnt. Die Konzentration der Taq-Polymerase entsprach einer Ausgangskonzentration von 5

units/  $\mu\text{l}$ . Die Konzentration der eingesetzten Template (chromosomale) DNA betrug 0,020 – 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Die angegebenen Mengen der Reaktionspartner wurden in ein 0,5 ml Cap pipettiert und gemischt, wobei die Taq-Polymerase zuletzt zugegeben wurde. Anschließend erfolgte die Amplifikation in einem Mastercycler Gradient (Fa. Eppendorf, Köln) mit folgenden Amplifikationsparametern: Initiale Denaturierung für 2 min bei 94°C, Denaturierung für 1 min bei 92°C, Annealing für 1 min bei 50°C und Proliferation für 2 min bei 72°C. Insgesamt erfolgten 35 Zyklen mit diesen Parametern und eine daran anschließende erneute Proliferationsphase von 5 min bei 72°C. Zum Abschluss wurden die Proben auf 8°C heruntergekühlt. Zuletzt wurde eine 1:50er Verdünnung der CARE-2-Sonde angefertigt und diese bei -20° C gelagert. Beim späteren Blotvorgang kam die CARE-2-Sonde in der 1:50er Verdünnung zum Einsatz.

### Enzymatische Spaltung

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
DNA	10 $\mu\text{g}$
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	1 $\mu\text{l}$
10xH-Restriktionspuffer	3 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	auf 30 $\mu\text{l}$ auffüllen

Tabelle 6: Enzymatischer Ansatz

Die vorgegebenen Mengen der Reagenzien wurden gemischt, wobei das Enzym *EcoRI* zuletzt dazugegeben wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C.

Am Nachmittag des nächsten Tages wurden je 6  $\mu\text{l}$  6x Mass-Loading Dye von MBI-Fermentas als Marker hinzugegeben und die Proben auf einem 1%-igen-Gel (Herstellung s. oben) durch Anlegen einer konstanten Spannung von 40 V bei einer Laufzeit von 16 h elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde für ungefähr 10 min in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und mit einem Geldoc 2000-System (Fa. Biorad, München) bei UV-Licht gefilmt. Hiermit konnte die erfolgreiche enzymatische Spaltung überprüft werden.

## CARE-2-Hybridisierung

Anschließend erfolgte die Übertragung des Gels auf eine Nylonmembran (Biodyne B transfer membrane, Fa. Pall Europe Ltd., Dreieich) mit Hilfe eines Vakuublotters. Hierfür wurde die Membran mit einer Größe von 14 x 15 cm und einer Dicke von 0,45 µm auf der Unterlage des Blotters fixiert und mit einer entsprechend großen Maske entlang der Membranränder abgeschlossen, wobei ein Raum von der Größe des Gels ausgespart blieb. Auf diesen unbedeckten Teil der Membran wurde das Gel vorsichtig übertragen.

Nach dem Anlegen des Vakuums mit 50 mbar musste dafür gesorgt werden, dass das Gel zu keinem Zeitpunkt der Behandlung mit den verschiedenen Lösungen trocken lief. Zuerst erfolgte eine 15 minütige Depurinierung mit Lösung A, anschließend eine 15 minütige Denaturierung mit Hilfe der Lösung B, und schließlich eine 15 minütige Neutralisierung mit Lösung C. Durch eine 90 minütige Behandlung mit 20xSSC wurde die Transferierung der DNA auf die Nylonmembran erreicht und der Blotvorgang beendet. Das Gel wurde verworfen, die Membran in eine Schüssel überführt und durch Markierungen auf der Membran ein Verwechseln der Seiten verhindert.

Nun bewirkte das Schwenken in 0,4M NaOH für 30 sec die Denaturierung und daran anschließend das Schwenken in 0,2M Tris-Cl pH 7.5 für 30 sec die Neutralisation der Membran. Nach dem kurzen Antrocknen der Membran auf Whatman-Filterpapier (Blotting Papier, Fa. Hartenstein, Würzburg), wurde durch einen UV-Cross-Linker (UV-Stratalinker 1800, Fa. Stratagene, CB Amsterdam Zuidoost, Netherlands) die Fixierung der DNA erreicht.

Die Membran wurde kurz in 5xSSC geschwenkt und danach in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben. Nachdem sich die Membran durch vorsichtiges Drehen des Glasröhrchens blasenfrei an die Glaswände angelegt hatte, wurden ungefähr 15 ml der vorher auf 42°C gewärmten Hybridisierungslösung der Marke ECL (= Enhanced Chemiluminescent Labeling) (Fa. Amersham Pharmacia Biotech/ Freiburg) ins Röhrchen hinzugegeben und für eine Stunde im Hybridisierungsofen (Fa. HYBAID Heidelberg Ltd.) bei 42°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde die CARE-2-Sonde mit ECL markiert. Jeweils 5 µl dH<sub>2</sub>O und CARE-2-Sonde wurden gemischt und für 5 min bei 100°C gekocht. Anschließend wurde die Mixtur sofort im Eisbad für 2 min abgekühlt. Danach wurden je 10 µl Labelling-Reagenz und Glutaraldehyd hinzugegeben und das ganze für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde das Gemisch zu 7 ml Hybridisierungslösung aus dem

Hybridisierungssofen gegeben, nochmals sorgfältig vermischt und anschließend zurück ins Hybridisierungsröhrchen überführt. Nun erfolgte über Nacht bei einer Inkubation bei 42°C der Hybridisierungsprozess.

## DNA-Detektion

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und die Membran für 5 min mit 50 ml 5xSSC im Hybridisierungssofen bei 42°C inkubiert. Danach wurde das 5xSSC verworfen und für 20 min mit Waschpuffer I gewaschen. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit Waschpuffer I für 10 min. Die Membran wurde in eine Schüssel überführt und mit Waschpuffer II (2xSSC) für 2 x 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Während dieser Zeit wurde eine Mischung aus Detektionslösung I und Detektionslösung II mit jeweils 8 ml angefertigt. Nach dem Abgießen des 2xSSC wurde die Membran für 1 min mit dem Mix der Detektionslösungen bedeckt und dieser anschließend sofort in ein kleines Röhrchen abgegossen. Die Detektionslösung wurde für die Aufbewahrung der Membran aufgehoben. Nach einem kurzen Antrocknen der Membran auf Whatman-Filterpapier, wurde diese vorsichtig und weitgehend blasenfrei in Klarsichtfolie gewickelt und mit der Vorderseite nach oben in eine Exponierkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde zur Darstellung der Signale ein Film (Hyperfilm<sup>EM</sup>ECL<sup>TM</sup>, Fa. Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, UK), mit einem Format von 18 x 24 cm, über die in Folie gewickelte Membran gelegt und dieser für ungefähr 15 min exponiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Film in einem speziellen Entwickler (CURIX 60, Fa. AGFA, Köln) entwickelt. Je nach Stärke der Signale konnte der Exponierprozess mit einem neuen Film mit einer verlängerten Exponierzeit wiederholt werden.

Zur Aufbewahrung der Membran für eine spätere Rehybridisierung wurde diese anschließend zusammen mit der zuvor aufbewahrten Detektionslösung in einer Klarsichttüte eingeschweißt.

### **2.3.8. Auswertung der molekularbiologischen Typisierung**

Alle Methoden zur molekularbiologischen Typisierung dienen zur Unterscheidung verschiedener Genotypen der einzelnen Isolate und zur Feststellung des Verwandtheitsgrads mehrerer Isolate zueinander.

Aufgrund dessen wurde von der Studienleitung ein einheitliches Schema entwickelt, nach welchem die Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden ausgewertet wurden und eine Aussage über den Verwandtheitsgrad gemacht werden konnte.

#### Bestimmung des genetischen Verwandtschaftsgrades von *C. albicans*-Isolaten

Unter Verwendung einer Technik galten zwei Isolate als „höchstwahrscheinlich“ verwandt, wenn beide identische Bandenmuster aufwiesen. Beim Fehlen oder zusätzlichen Vorkommen einer Bande wurde beiden Isolaten die Bezeichnung „wahrscheinlich verwandt“ zugeordnet. Fehlten mehr als eine Bande bzw. waren mehr als eine Bande zusätzlich vorhanden wurden beide Isolate als „nicht verwandt“ angesehen.

Zur endgültigen Beurteilung des Verwandtschaftsgrads wurden beide zur Typisierung der *C. albicans* Spezies verwendeten Methoden heran gezogen. War eine Verwandtschaft mit beiden Methoden als „höchstwahrscheinlich“ eingestuft worden, stellte diese Übereinstimmung den endgültigen Verwandtschaftsgrad dar. Lautete das Ergebnis einmal „höchstwahrscheinlich“ und einmal „wahrscheinlich“ verwandt, war der Verwandtschaftsgrad als „wahrscheinlich“ anzusehen. Eine „möglicherweise“ vorhandene Verwandtschaft war das Ergebnis, wenn eine Methode mit „höchstwahrscheinlich“ bzw. „wahrscheinlich“ und die andere Analyse mit einem „nicht verwandt“ bewertet wurde. Ergaben beide Methoden ein „nicht verwandt“, konnte eine Ähnlichkeit beider Isolate ausgeschlossen werden.

#### Bestimmung des genetischen Verwandtschaftsgrades bei *C. parapsilosis*-Isolaten

Die Auswertung innerhalb einer Methode folgte demselben Schema wie bei *C. albicans* beschrieben.

Beim Vergleich der Methoden konnte eine „höchstwahrscheinliche“ Verwandtschaft nur angenommen werden, wenn alle drei Methoden, welche zur genotypischen Bestimmung dieser Gruppe zum Einsatz kamen, in ihren Einzelergebnissen ein „höchstwahrscheinlich“ ergaben. Wurden zwei Methoden als „höchstwahrscheinlich“ und eine als „wahrscheinlich“ bewertet, galt der Verwandtschaftsgrad „wahrscheinlich“. „Möglicherweise verwandt“ lautete das Ergebnis bei einem als „höchstwahrscheinlich“ und zwei als „wahrscheinlich“ befundenen Verfahren. Ebenso im umgekehrten Fall.

Weiterhin wurden zwei als „höchstwahrscheinlich“ und eine als „nicht verwandt“ Ergebnisse mit einem „möglicherweise“ vorhandenen Verwandtschaftsgrad versehen. Kamen alle drei Analysen zum Ergebnis „nicht verwandt“, konnte eine genetische Verwandtschaft ausgeschlossen werden.

#### Bestimmung des genetischen Verwandtheitsgrades bei *C. lusitaniae*- und *C. guilliermondii*-Isolaten

Die Beurteilung der Methoden folgte demselben Schema, welches zur Auswertung der Ergebnisse bei *C. albicans* verwendet wurde.

### **2.3.9. Einteilung des Schweregrads nach Isolationsort**

#### Einteilung der Infektionen nach der Falldefinition

Die Einteilung der Infektionen im Follow-up-Intervall erfolgte in Anlehnung an die Falldefinitionen der ESPED-Studie {64}.

##### Gruppe der sicheren Infektion

Konnten Erreger aus Medien wie „Blut“, „Liquor“, „Zentrale Katheter“, „Pleura-“, oder „Peritonealabstrich“ isoliert werden, fand eine Zuordnung zur Gruppe der sicheren Infektion statt.

##### Gruppe der wahrscheinlichen Infektion

Positive Kulturen des „Respirationstraktes“ und mindestens einer weiteren Isolationsstelle – ausgenommen derer der Gruppe der sicheren Infektion – hatten eine Einteilung zur Gruppe der wahrscheinlichen Infektion zur Folge.

##### Gruppe der möglichen Infektion

Bei nur einem positiven Isolationsort, der weder der Gruppe der sicheren noch der wahrscheinlichen Infektion zuzuordnen war, ließ eine Zuordnung in die Gruppe der möglichen Infektion zu.



### **3. Ergebnisteil**

Insgesamt nahmen 135 Kinderkliniken aus dem gesamten Bundesgebiet (außer Sachsen-Anhalt) an der Studie teil. Am Stichtag (29.05.2001) erhielten wir Zusendungen von 106 Kinderkliniken, deren Patienten die Einschlusskriterien erfüllten. Die verbleibenden 29 Kliniken mit zuvor zugesicherter Teilnahme, jedoch ohne Einsendung von Probenmaterial, gaben an, am Stichtag keine Patienten mit den festgelegten Studienkriterien in stationärer Behandlung gehabt zu haben. Die Städte München und Köln hatten, nach Zusammennahme aller teilnehmenden Kliniken, mit 15-16 Patienten die höchste Anzahl an Patienten. Die höchste Einsendezahl einer einzelnen Klinik stellte die Bielefelder Kinderklinik mit zwölf Patienten und 24 Proben dar. Insgesamt nahmen 318 Patienten mit einer Gesamtprobenanzahl von 656 an der Studie teil.

#### **3.1. Angaben zu den Patientendaten (Formblatt 2)**

##### Geschlechtsverteilung

Es ergab sich eine Verteilung der Geschlechter mit 163 weiblichen und 155 männlichen Patienten. Der prozentuale Anteil der weiblichen Teilnehmer lag somit bei 51,3 %, wohingegen der männliche Anteil 48,7 % betrug. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied bei der Besiedelung der beiden Geschlechter ( $p = 0,609$ ).

##### Verteilung des Geburtsgewichts nach Gewichtsklassen

Um den Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und erhöhtem Risiko an einer systemischen Pilzinfektion zu erkranken darzustellen, wurden hinsichtlich des Geburtsgewichts Gruppen gebildet, welchen das tatsächliche Geburtsgewicht zugeordnet wurde.

Sechs (1,9%) Frühgeborene hatten ein Geburtsgewicht von „0-500 g“. 120 (37,7%) Patienten wiesen ein Geburtsgewicht von „501-1000 g“ auf, beide Gruppen gehören zu den „extremely-low-birth-weight-infants“ (ELBW). Somit wiesen in dieser Gruppe 126 (39,6%) Kinder ein extrem niedriges Geburtsgewicht mit unter 1000 g auf.

Den größten Anteil stellten 190 (59,7%) Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht von „1001-1500 g“ dar, welche in der Gruppe der „very-low-birth-weight-infants“ (VLBW) zusammengefasst werden. Zwei Patienten (0,6%) lagen mit ihrem Geburtsgewicht knapp über der „1500 g-Grenze“ und gehörten zu der Gruppe der "low-birth-weight-infants" „1501-2000 g“. Die Daten wurden aufgenommen, die Patienten jedoch formal nicht in die Studie eingeschlossen.

### Kolonisationsrate

Insgesamt 72 (22,6%) der 318 Patienten waren mit einem oder mehreren pilzlichen Erregern besiedelt. Betrachtete man die Gruppe der ELBW (n=126) (<1000 g), waren 44 (34,9%) dieser Frühgeborenen besiedelt.

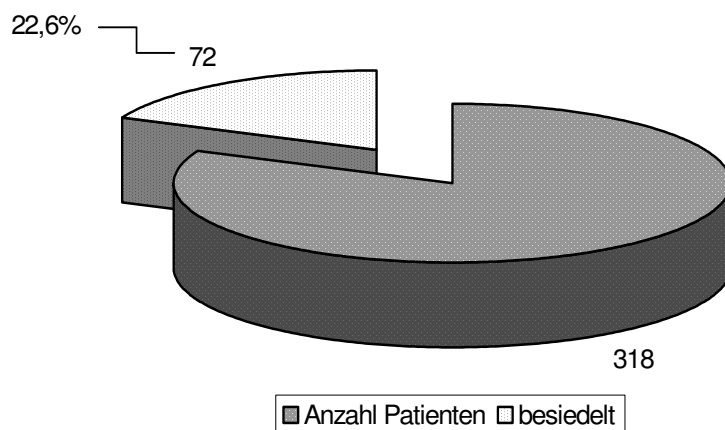


Abbildung 2: Besiedlungsrate

### Besiedlung bei Mehrlingen

Ein wichtiger Aspekt besteht im Zusammenhang mit einer Besiedlung unter Mehrlingen, da hier der genetische Verwandtschaftsgrad der Hefeisolate von besonderem Interesse ist. Insgesamt waren 58 (18,2%) Mehrlinge in die Studie eingeschlossen, wobei hier zunächst nicht in Zwillinge, Drillinge oder andere Mehrlinge unterteilt wurde. Eine Besiedlung konnte bei fünf (8,6%) Frühgeborenen festgestellt werden. Bei näherer Betrachtung dieser fünf besiedelten Patienten, konnten diese

insgesamt vier Zwillingspaaren zugeordnet werden. Hierbei ist anzumerken, dass nicht beide Partner des Paares besiedelt sein mussten. In einem Fall waren tatsächlich beide Zwillingspartner besiedelt. Im Falle der drei restlichen Paare lag nur bei einem dazugehörigen Partner eine Besiedlung mit Pilzen vor.

### Zusammenhang zwischen Geburtsgewicht und Besiedlung

Bei den Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von „0-500g“ waren drei besiedelt und drei nicht besiedelt, entsprechend einer 50%-igen Kolonisation in dieser Gruppe. Die meisten besiedelten Frühgeborenen fanden sich in der Gruppe „501-1000g“ mit 41 (34,1%) Patienten. Die übrigen 79 Frühgeborene dieser Gruppe waren nicht besiedelt. 28 (14,7%) besiedelte Kinder mit einem Geburtsgewicht zwischen „1001-1500g“ standen in derselben Gewichtsklasse 162 nicht besiedelten entgegen. Fasst man die Gewichtgruppen bis 1000g zusammen, ergeben sich bei den Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 1000g („extremely-low-birth-weight-infants“ = ELBW) bei 44 (34,9%) von 126 eine Kolonisation. Und somit bei den Frühgeborenen < 1500g („very-low-birth-weight-infants“ = VLBW) eine Besiedelung bei 72 (22,7%) von 316 Frühgeborenen. Beide Frühgeborene, die oberhalb der „1500g“-Grenze lagen waren nicht besiedelt.

### Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Besiedlung

Insgesamt waren 72 der 318 Patienten mit pilzlichen Erregern besiedelt. Zur besseren Einteilung wurden auch hier Gruppen anhand des Gestationsalters gebildet. Nur zwei (2,7%) der besiedelten Patienten wiesen ein Gestationsalter von 20.-23. Wochen auf. Der größte Anteil der besiedelten Frühgeborenen, nämlich 34 (47,2%), kam mit einem Gestationsalter von 24.-27. Wochen zur Welt. 31 (43,0%) besiedelte Patienten wiesen ein Gestationsalter von 28.-31. Wochen auf. 5 (6,9%) besiedelte Kinder wurden mit einem Gestationsalter von 32.-36. Wochen geboren.

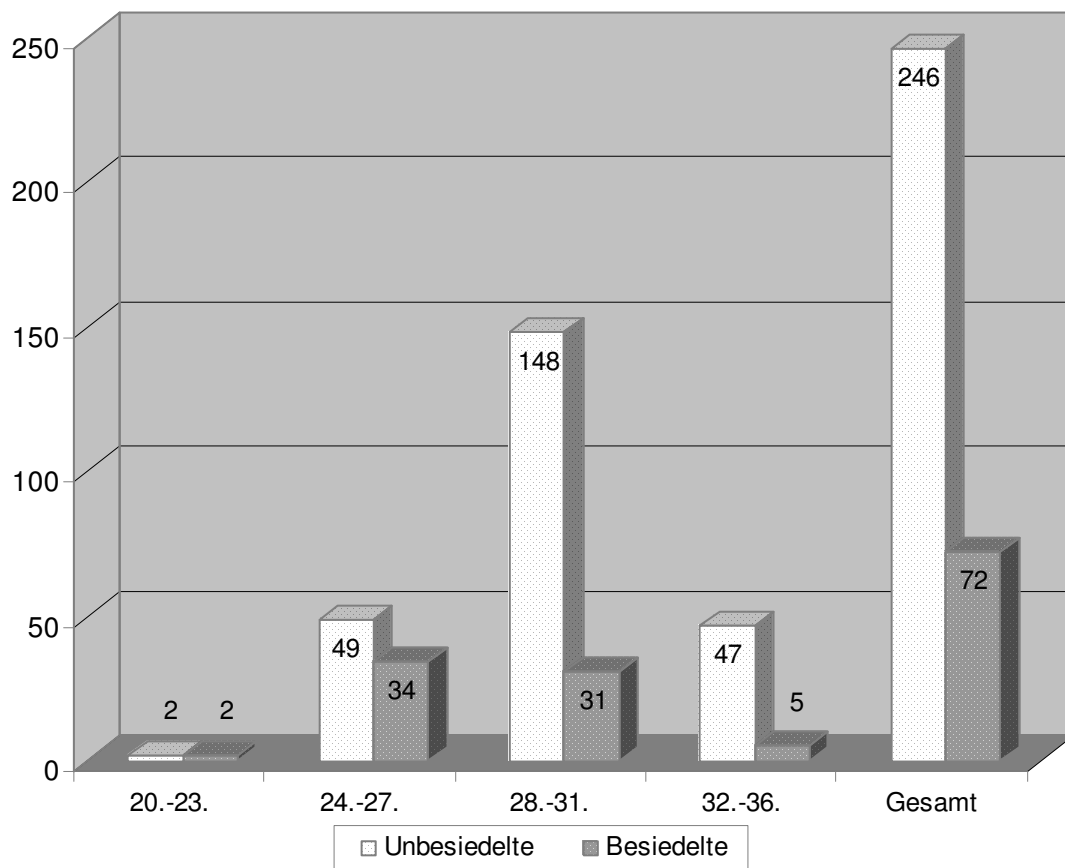


Abbildung 3: Gestationsalter im Zusammenhang mit Besiedelung

### Zusammenhang zwischen Geburtsmodus und Besiedelung

282 Patienten kamen per sektio caesarea zur Welt. Hiervon waren 62 (21,9%) der Kinder besiedelt. 36 Frühgeborene wurden vaginal entbunden, wovon zehn (27,7%) besiedelt waren. Hieraus resultierte, dass kein signifikanter Unterschied im Zusammenhang zwischen dem Geburtsmodus und einer Keimbeseidlung bestand ( $p = 0,434$ ).

### Erregerspektrum

Insgesamt wurden 85 Isolate verschiedener Spezies isoliert. Bei Mehrfachbesiedlung eines Patienten mit demselben Keim wurde dieser nur einfach gewertet. Den größten Anteil der Erreger stellten *Candida species* ( $n_{\text{total}} = 58$ ) dar.

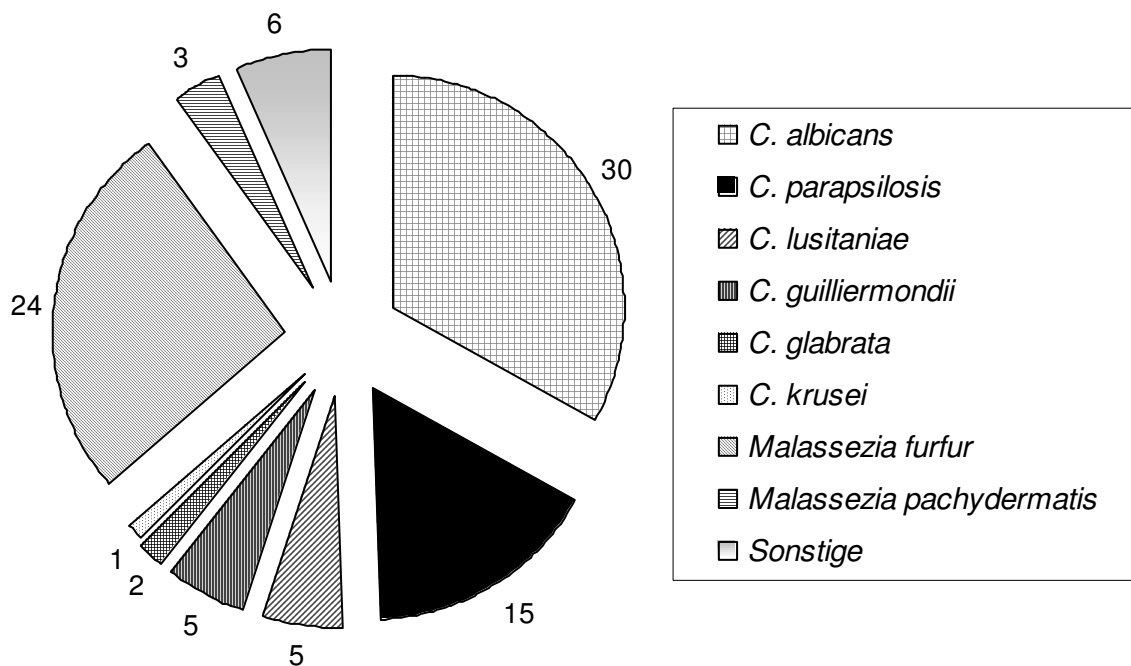


Abbildung 4: Erregerspektrum *Candida*–*Malassezia*-Sonstige

Die Gruppe „Sonstige“ bildeten Erreger der Spezies *Aspergillus fumigatus* (n=2), *Trichosporon asahii* (n=2), *Fusarium species* (n=1) und *Paecilomyces* (n=1).

#### Angaben zur antibiotischen Therapie

Antibiotisch behandelt wurden 151 Patienten. Allerdings waren hiervon nur 53 (35,1%) Frühgeborene besiedelt und 98 (64,9%) somit unbesiedelt. Insgesamt 167 Frühgeborene erhielten keine antibiotische Therapie, diese schlüsselten sich in 148 (88,6%) unbesiedelte und 19 (11,4%) kolonisierte Patienten auf. Es bestand ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen einer Antibiotikatherapie und einer damit verbundenen Kolonisation der Frühgeborenen, da 73,6% der besiedelten Frühgeborenen eine Antibiose erhielten ( $p < 0,001$ ).

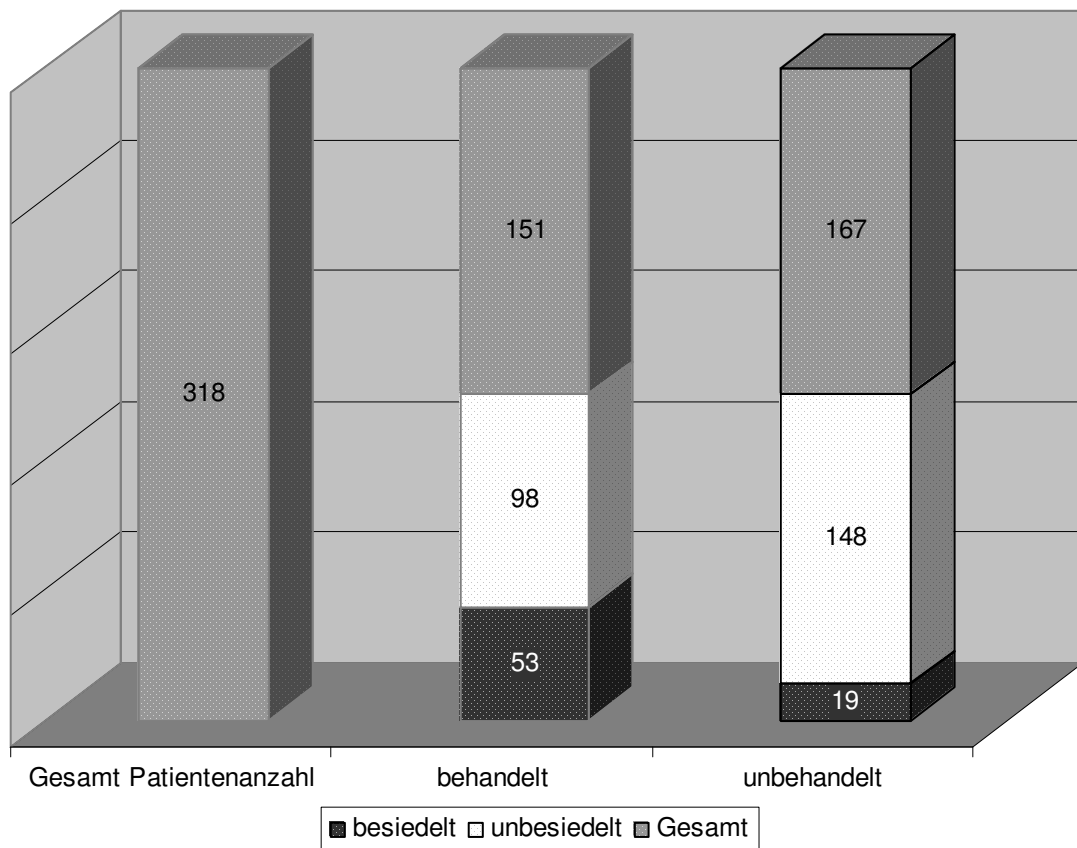


Abbildung 5: Behandlungen mit Antibiotika

### Angaben zur antimykotischen Therapie

Insgesamt wurden 84 (26,4%) Patienten antimykotisch behandelt. Hiervon waren 68 (80,9%) Frühgeborene unbesiedelt und nur 16 (19,1%) am Abstrichtag besiedelt. Von den 234 unbehandelten Patienten waren 178 (76,1%) unbesiedelt. Dem standen 56 (23,9%) besiedelte, aber nicht behandelte Frühgeborene gegenüber ( $p = 0,358$ ). Die topische Therapie überwog bei den 68 unbesiedelten Kindern mit insgesamt 56 lokal bzw. topisch verabreichten Antimykotika. In 9 Fällen kamen systemische Medikamente zum Einsatz (Mehrfachnennungen waren möglich). Bei drei Frühgeborenen wurde eine Kombinationstherapie aus systemischem und lokalem Antimykotikum bevorzugt. Ebenso überwog die alleinige topische Anwendung der Antimykotika bei insgesamt 13 Frühgeborenen aus der Gruppe der kolonisierten Patienten. In zwei Fällen kamen rein systemisch wirkende Substanzen zum Einsatz. Ein Frühgeborenes erhielt eine Kombination aus beidem.

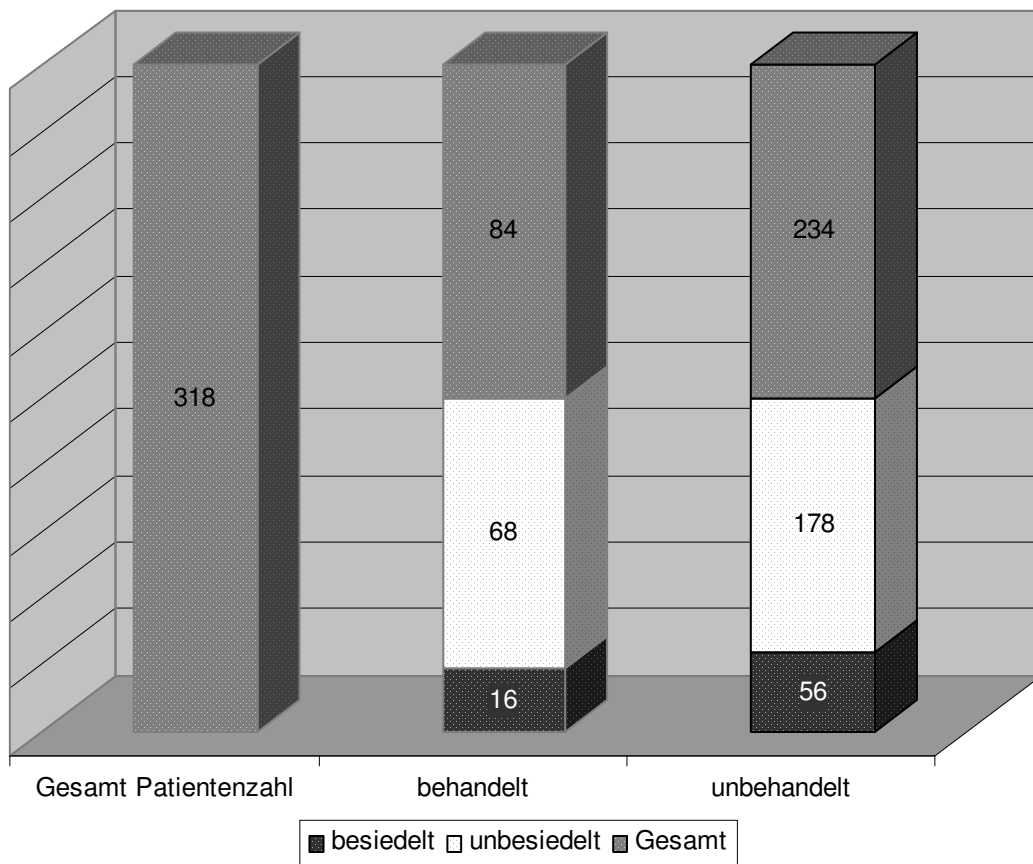


Abbildung 6: Behandlungen mit Antimykotika

Gründe für die Antimykotika-Gabe stellten zum größten Teil eine prophylaktische Verabreichung (n = 62) dar. Weiterhin wurden genannt: Amnioninfektionssyndrom (n = 2), Soordermatitis (n = 2), nekrotisierende Enterocolitis (n = 2), zur Prophylaxe bei gleichzeitiger bronchopulmonaler Dysplasie (n = 2), Verdacht auf Pilzinfektion (n=2), Vaginal-*Candidiasis* der Mutter (n = 2), Kortikosteroidtherapie (n = 2) und Sepsis (n = 1). Es waren auch Mehrfachnennungen möglich.

Antibiotische und antimykotische Behandlung

12 besiedelte und 44 nicht besiedelte Frühgeborene wurden gleichzeitig antibiotisch und antimykotisch therapiert.

## Parenterale Ernährung und Besiedlung

48 (66,7%) der 72 mit *Candida*-Spezies besiedelten Patienten wurden parenteral ernährt. Im Gegensatz dazu wurden 113 (45,9%) von 246 unbesiedelten Frühgeborenen parenteral ernährt. Die Ergebnisse spiegeln wider, dass ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen einer parenteralen Ernährung von Frühgeborenen und einer Pilzbesiedlung besteht ( $p = 0,002$ ). Von allen parenteral ernährten Frühgeborenen wurden in 18 Fällen *Candida*-Spezies und 13-mal *Malassezia furfur* isoliert.

## Isolationsorte

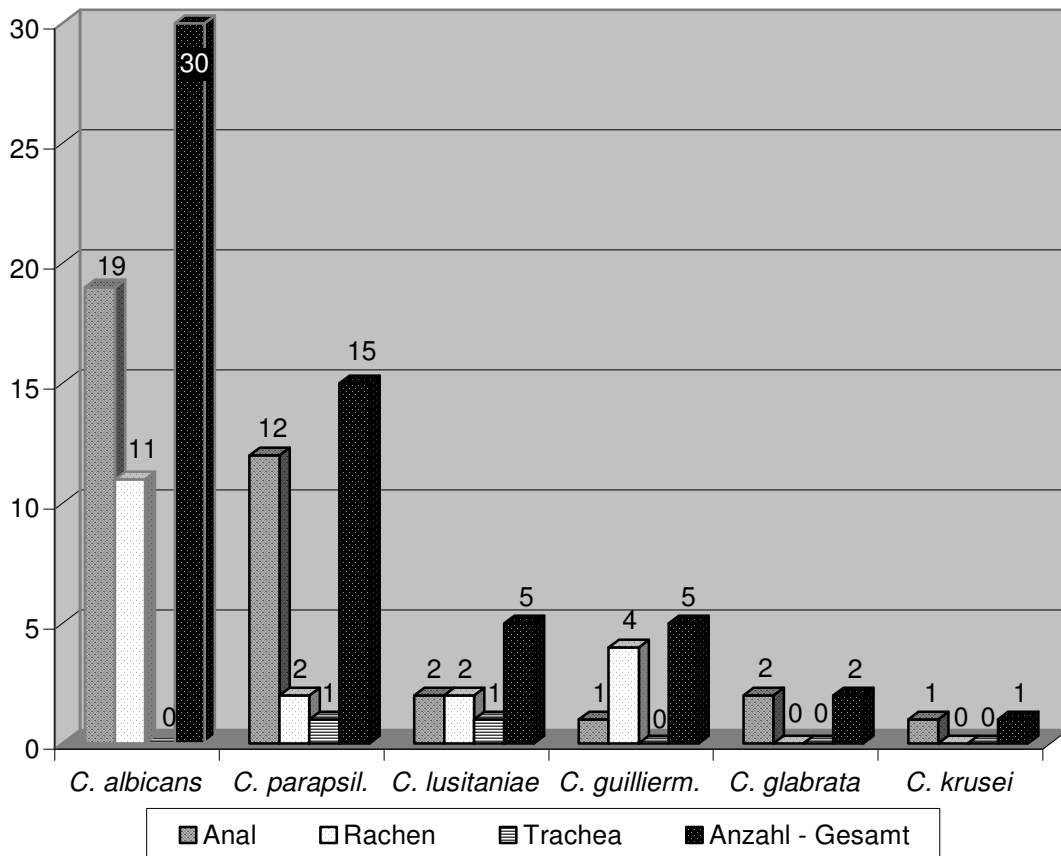


Abbildung 7: Isolationsorte der Gruppe *Candida*

Den Hauptisolationsort der Spezies *Malassezia furfur* stellte mit 23 Isolaten die Analregion dar. Nur ein Isolat dieser Spezies wurde im Rachenabstrich gefunden. Zwei



Erreger der Spezies *Malassezia pachydermatis* wurden im Analbereich, ein weiterer in der Rachenregion isoliert.

Die beiden *Aspergilli fumigati* waren einmal aus der Rachenregion und einmal aus dem Trachealsekret isoliert worden. *Fusarium species* wurde einmal aus dem Rachen isoliert. Ebenso war auch *Paecilomyces* nur einmal im Rachenabstrich nachzuweisen. Beide Isolate der Spezies *Trichosporon asahii* wurden im Analabstrich identifiziert.

### 3.2. Follow-up (Formblatt 3)

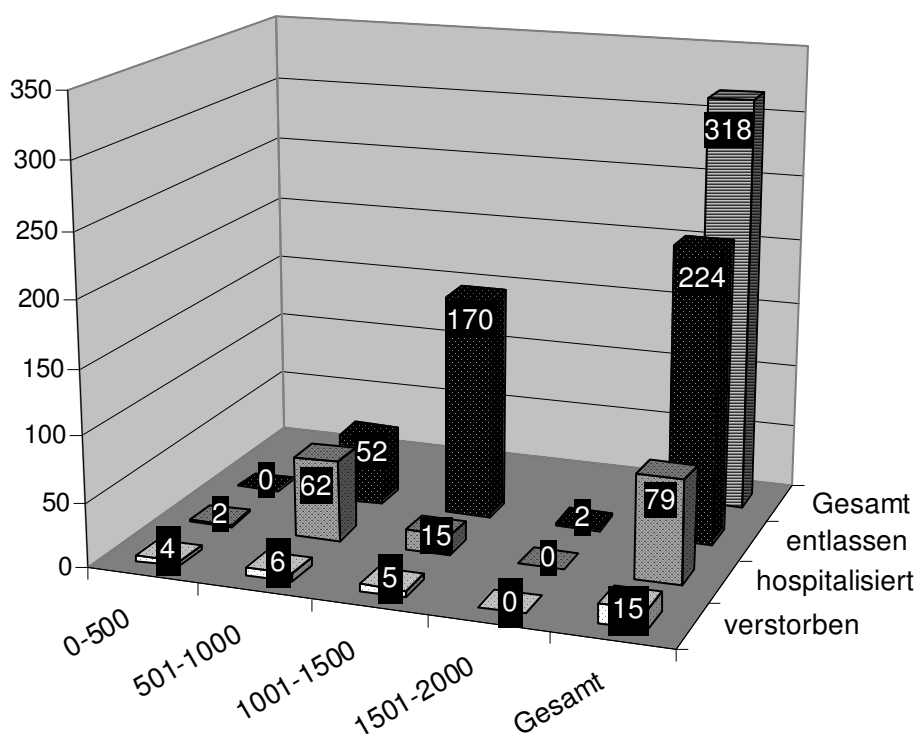


Abbildung 8: Patientenstatistik nach 60 Tagen (30.07.2001)

Von den insgesamt 318 teilnehmenden Frühgeborenen waren zum Zeitpunkt des Follow-up (nach 60 Tagen) 15 Patienten verstorben. Vier Frühgeborene (66,6%) mit einem ehemaligen Geburtsgewicht von „0-500g“ hatten den Zeitraum von 60 Tagen nicht überlebt. Sechs (4,9%) Frühgeborene mit einem Ausgangsgewicht von „501-1000g“ und fünf (2,6%) Patienten mit einem ursprünglichen Geburtsgewicht von „1001-

1500g“ waren verstorben. Am Abstrichtag waren nur fünf der verstorbenen Patienten besiedelt. In drei Fällen konnte *Malassezia furfur* und jeweils einmal *C. albicans* und *C. parapsilosis* als pilzlicher Erreger isoliert werden. Zum Zeitpunkt des Follow-up-Intervalls befanden sich noch 79 Frühgeborene in stationärer Behandlung. Den größten Anteil stellten 62 Frühgeborene, aus der Gruppe mit einem ursprünglichen Geburtsgewicht von „501-1000g“ dar. Insgesamt 224 (70,4%) Patienten konnten innerhalb des Follow-up-Intervalls nach stationärem Aufenthalt entlassen werden. Hierbei konnte der Hauptanteil mit 169 Frühgeborenen in der Gruppe der „1001-1500g“ schweren Patienten verzeichnet werden.

### **3.3. Systemische Infektionen (Formblatt 4)**

Nach 60 Tagen (30.07.2001) startete das Follow-up-Intervall. Alle von den Kliniken zurück gesendeten Formblätter wurden nach systemischen Infektionen mit Pilzen ausgewertet.

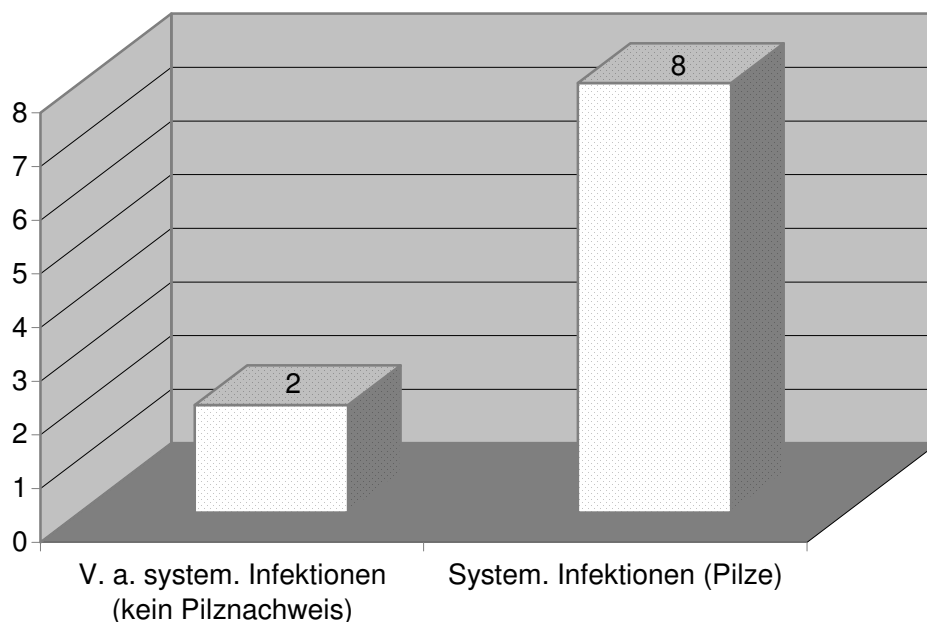


Abbildung 9: Systemische Infektionen

Da das Hauptaugenmerk auf systemischen Pilzinfektionen lag, konnten vereinzelte Rückmeldungen über bakterielle systemische Infektionen nicht in die Wertung genommen werden. Bei zwei Patienten bestand nur der Verdacht auf eine systemische Pilzinfektion, allerdings konnte zur Bestätigung kein Erregernachweis erbracht werden.

### 3.3.1. Isolationsorte bei systemischer Infektion

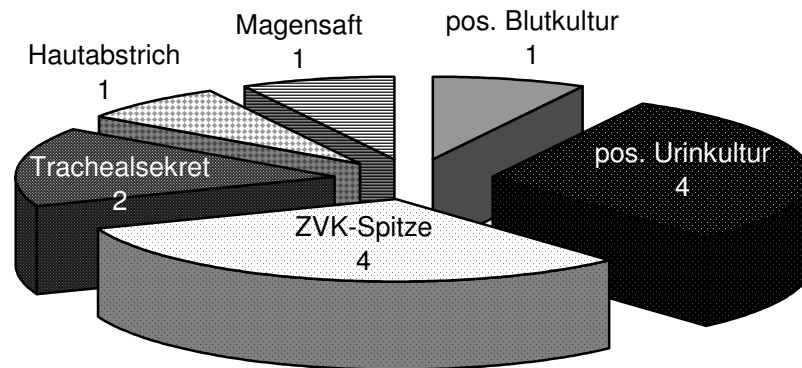


Abbildung 10: Isolationsorte bei systemischen Infektionen

Anhand oben genannter Isolationsorte wurde eine Einteilung der systemischen Infektionen nach der vorher festgelegten Faldefinition vorgenommen, da ein nachgewiesener Zusammenhang zwischen Erregerquelle und Schwere der Infektion besteht.

### 3.3.2. Einteilung systemischer Infektionen in Schweregrade

Nach Auswertung der Daten des Follow-up-Intervalls konnten acht systemische Pilzinfektionen festgestellt werden. Diese wurden anhand der in 2.3.9. genannten Gruppen in Schweregrade eingeteilt. Es resultierte eine Einteilung der acht Fälle in vier „sichere“, eine „wahrscheinliche“ und drei „mögliche“ Infektionen.

### 3.3.3. Besiedlung und spätere Entwicklung einer systemischen Infektion

Bei der Auswertung des Follow-up wurde die Entwicklung einer systemischen Pilzinfektion bis zum 30.07.2001, hinsichtlich des Besiedlungsstatus zum Zeitpunkt der Erhebung der Kolonisationsdaten am Stichtag (29.05.2001) untersucht. In diesem Zusammenhang fiel auf, dass nur vier der Patienten mit *Candidiasis* am bundesweiten

Abstrichtag besiedelt und vier unbesiedelt waren. Somit entwickelten hinsichtlich des Gesamt-Patientenkollektivs acht (2,5%) Frühgeborene eine systemische Pilzinfektion. Bezogen auf den Kolonisationsstatus am Abstrichtag (72 besiedelte Frühgeborene) befanden sich darunter nur vier Frühgeborene (5,5%), die auch schon am Stichtag besiedelt waren. Die übrigen vier Patienten (1,6% von 246 nicht besiedelten Frühgeborenen) mit systemischer Pilzinfektion wiesen am Stichtag noch keine Besiedelung auf. In der Gruppe der ELBW (n = 126) entwickelten von den 44 besiedelten Frühgeborenen sieben (15,9%) Frühgeborene eine *Candidiasis*. Davon waren jedoch nur vier bereits am Abstrichtag besiedelt (9,1%).

Die folgende Tabelle stellt dar, in wie weit das Erregerprofil bei Besiedlung am Abstrichtag mit dem bei entwickelter systemischer Infektion übereinstimmt.

### 3.3.4. Erregerspektrum bei systemischer Infektion

Patienten	1	2	3	4	5	6	7	8
Studien-Nr.	23/24	115/116	171/172	203/204	249/250	307/308	422/424	11/12
Besiedlung (29.05.01)	<i>C. alb.</i>	-	<i>C. guill.</i>	<i>C. para.</i>	-	<i>C. para.</i>	-	-
system. Infektion	<i>C. para.</i>	<i>C. para.</i> <i>C. guill.</i>	<i>C. guill.</i>	<i>C. para.</i> <i>C. spec.</i>	Hefen (allg.)	<i>C. para.</i>	<i>C. trop.</i>	<i>C. alb.</i>

Tabelle 7: Erregerspektrum am Abstrichtag und bei entwickelter systemischer Infektion; *C. alb.* = *C. albicans*, *C. para.* = *C. parapsilosis*, *C. guill.* = *C. guilliermondii*, *C. trop.* = *C. tropicalis*.

Nur bei der Hälfte der Patienten mit *Candidiasis*, lag eine Besiedlung schon zum Zeitpunkt des Abstrichtages vor. Bei drei Patienten stimmte das am Abstrichtag festgelegte Erregerprofil mit dem im Follow-up diagnostizierten überein.

### 3.3.5. Übersicht der Patientendaten mit systemischer Pilzinfektion

Patienten	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Studien-Nr.</b>	23/24	115/116	171/172	203/204	249/250	307/308	422/424	11/12
parenterale Ernährung <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibiotikatherapie <sup>2</sup>	+	-	+	-	+	+	+	+
Kortikosteroide <sup>3</sup>	+	-	-	+	-	-	-	-
Intubation <sup>4</sup>	+	-	-	-	+	-	+	-
Gefäßkatheter <sup>5</sup>	+	+	-	-	+	+	+	-
Antimykotika (t/sy)	-	-	+ (sy)	-	+ (t)	+ (t)	+ (t)	+ (t)
Geburtsgewicht (g)	490	700	680	750	1345	750	780	788
Gestationsalter (SSW)	23	25	26	25	35	26	24	26
Geburtsmodus (v/s)	v	v	s	s	s	v	s	v
Ausbruch der Infektion (p.p.) nach (d)	32	11	17	25	13	12	24	38
entlassen (e), verstorben (v), hospitalisiert (h)	h	h	h	h	v	h	h	e

*Tabelle 8 : Übersicht über individuelle Patientendaten mit systemischer Pilzinfektion; <sup>1-5</sup> = Risikofaktoren für den Erwerb von systemischen Pilzinfektionen; t = topische Applikation, sy = systemische Applikation, v = vaginal, s = sectio, p.p. = post partum, (e), (v) und (h) beziehen sich auf den Zeitpunkt des Follow-up.*

Das Formblatt 2 enthielt Fragen zu verschiedenen Risikofaktoren (1-5) bzw. Interventionen. Jeder der Patienten wies mindestens zwei der in der Studie erfragten Risikofaktoren auf. Sieben der acht Patienten waren in die Gruppe der ELBW Frühgeborenen, welche mit einem extrem hohen Risiko für den Erwerb einer systemischen *Candidiasis* behaftet sind, einzuordnen. Hiermit korrelierte auch das Gestationsalter, mit Ausnahme von Patient 5, der mit 35 SSW ein höheres Gestationsalter aufwies, als die übrigen Patienten (Mittelwert: 26,5 SSW). Es fiel auf, dass fünf Säuglinge mit Antimykotika behandelt wurden. Mehrmals wurde hierfür die Indikation „Prophylaxe bei gleichzeitiger Antibiose“ angegeben. Zwei Frühgeborene

waren trotz antimykotischer Therapie bereits am Abstrichtag besiedelt. Jeweils die Hälfte der Frühgeborenen wurde vaginal entbunden, die andere Hälfte wurde per Kaiserschnitt geboren. Die Dauer nach der sich die Infektion manifestierte, wurde unabhängig von der Kenntnis des Besiedelungsstatus ab der Geburt berechnet. Der früheste Ausbruch wurde bei Patient 2 nach 11 Tagen verzeichnet, wohingegen der späteste Ausbruch bei Patient 8 nach 38 Tagen erfolgte. Der Mittelwert hierfür lag bei 21,5 Tagen. Zum Zeitpunkt des Follow-up befanden sich noch sechs der Patienten mit systemischer Pilzinfektion in stationärem Aufenthalt. Ein Frühgeborenes war bereits entlassen und ein Patient verstorben.

### 3.3.6. Antimykotische Therapie

Patienten	1	2	3	4	5	6	7	8
Studien-Nr.	23/24	115/116	171/172	203/204	249/250	307/308	422/424	11/12
Konvention. Ampho B	-	-	-	TD: 0,55 BD: 21	-	-	TD: 1 BD: 14	TD: 0,55 BD: 21
Liposomales Ampho B	-	-	TD: 2 BD: 8	-	TD: 2 BD: 2	-	-	-
Fluconazol	TD: 6 BD: 14	TD: 6,4 BD: 9	TD: 6 BD: 24	TD: 12 BD: 7	-	TD: 6 BD: 21	-	TD: 12 BD: 4
5-Fluorocytosin	-	-	TD: 120 BD: 29	TD: 72 BD: 19	-	-	-	-

*Tabelle 9: Unterschiede in der antimykotischen Behandlung; TD = maximale Tagesdosis in mg/ kg/ d, BD = Behandlungsdauer in Tagen.*

In der antimykotischen Therapie ergaben sich unterschiedliche Kombinationstherapien. Mehrheitlich wurde mit Fluconazol therapiert. Die Dosierung und Behandlungsdauer der einzelnen Medikamente variieren unter den jeweiligen Patienten bzw. Kliniken. Ein einheitliches Dosierschema ist nicht erkennbar und nur teilweise können Übereinstimmungen ersichtlich werden. Diese Daten spiegeln allerdings Therapiestrategien eines kleinen Patientenkollektivs wider und können daher nicht repräsentativ auf die gesamte Frühgeborenenpopulation übertragen werden.

### 3.4. Ergebnisse der MHK

#### 3.4.1. MHK-Werte der Kontrollstämme

Spezies	Nummer	5-Fluorocytosin	Fluconazol	Amphotericin B	Itraconazol
<i>C. albicans</i>	ATTC 90028	1	0,12	0,5	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	ATTC 22013	0,5	2	1	0,5
<i>C. guilliermondii</i>	CBS 1909	0,12	2	0,25	1
<i>C. lusitaniae</i>	CBS 5901	0,06	0,12	1	0,25
<i>C. glabrata</i>	ATTC 90030	0,06	4	1	1
<i>C. krusei</i>	ATTC 6258	16 ♦	32 (♦)	1	1 *

Tabelle 10: MHK-Werte der Kontrollstämme in  $\mu\text{l/ml}$ ; Legende: \* = resistent, ♦ = intermediär, (♦) = Empfindlichkeit dosisabhängig.

Alle Kontrollstämme, ausgenommen *C. krusei*, zeigten ein normales Empfindlichkeitsverhalten gegenüber allen vier Antimykotika. Die Kontrolle der Gruppe *C. krusei* wich in mehreren Werten davon ab. Der einzige während der Studie isolierte Vertreter der Gruppe *C. krusei* (FG343) zeigte, ebenso wie seine zugehörige Kontrolle, Abweichungen in der Empfindlichkeit gegenüber den in der Studie getesteten antimykotischen Substanzen.

### 3.4.2. MHK-Werte aller Isolate

Spezies	Medikament	MHK <sub>50%</sub>	MHK <sub>90%</sub>	range	Mittelwert
<i>C. albicans</i> (n=30)	5-Fluorocytosin	0,12	>64	0,06 - >64	12,93
	Fluconazol	0,25	1	0,12 - 1	0,43
	Amphotericin B	0,5	1	0,5 - 1	0,68
	Itraconazol	0,12	0,25	0,06 - 0,05	0,19
<i>C. parapsilosis</i> (n=15)	5-Fluorocytosin	0,12	0,5	0,06 - 0,5	0,17
	Fluconazol	0,5	0,5	0,25 - 1	0,43
	Amphotericin B	1	1	0,5 - 1	0,73
	Itraconazol	0,12	0,25	0,06 - 0,25	0,11
<i>C. lusitaniae</i> (n=5)	5-Fluorocytosin	0,06	0,06	0,06	0,06
	Fluconazol	0,25	0,5	0,25 - 1	0,45
	Amphotericin B	1	1	1 - 2	1,2
	Itraconazol	0,25	0,25	0,06 - 0,25	0,186
<i>C. guilliermondii</i> (n=5)	5-Fluorocytosin	0,12	0,12	0,06 - 0,12	0,096
	Fluconazol	2	2	0,12 - 4	1,824
	Amphotericin B	0,5	0,5	0,25 - 1	0,5
	Itraconazol	0,25	0,25	0,03 - 0,5	0,256
<i>C. glabrata</i> (n=2)	5-Fluorocytosin	*	*	0,06	0,06
	Fluconazol	*	*	4 - 8	6
	Amphotericin B	*	*	0,5 - 1	0,75
	Itraconazol	*	*	0,5 - 1	0,75

Tabelle 11: MHK-Werte in µg/ ml; \* aufgrund der geringen Isolatanzahl keine Auswertung.

Die minimale Hemmkonzentration wurde auch für ein Isolat der Gruppe *C. krusei* bestimmt. Aufgrund der geringen Anzahl dieser Gruppe (n=1) erfolgte nur die Auswertung der Einfachwerte: 5-Fluorocytosin: 16, Fluconazol: 64, Amphotericin B: 2, Itraconazol: 0,5 (in µg/ml).



### 3.4.3. Resistenzdaten einzelner Isolate

Spezies	Studiennr.	5-Fluorocytosin	Fluconazol	Amphotericin B	Itraconazol
<i>C. albicans</i>	(FG 263/ 1)	> 64 *	1	1	0,12
<i>C. albicans</i>	(FG 264)	> 64 *	1	1	0,12
<i>C. albicans</i>	FG 265	> 64 *	1	0,5	0,12
<i>C. krusei</i>	FG 343	16 ♦	64 *	2 *	0,5
<i>C. lusitaniae</i>	FG 64	0,06	0,25	2 *	0,25
<i>C. glabrata</i>	FG 506/ 2	0,06	8	1	1 *

Tabelle 12: MHK-Werte resistenter Stämme in  $\mu\text{l/ ml}$ ; Legende: \* = resistent, ♦ = intermediär; □ = Patienten einer Klinik; ( ) = mehrere Isolate eines Patienten.

Die Auswertung der Resistenzdaten ergab, dass im Falle eines Patienten mit zwei Isolaten (FG263/1 und FG264), beide resistent gegenüber 5-Fluorocytosin waren. Ein weiterer Patient der Klinik (FG265), der ebenfalls mit einem *C. albicans* besiedelt war, wies dieselbe Resistenzlage des Isolates gegenüber 5-Fluorocytosin auf. Die Auswertung der molekularen Typisierung hat bestätigt, dass allen drei Isolaten eine „höchstwahrscheinliche Verwandtschaft“ zugeordnet werden kann.

### **3.5. Ergebnisse der verschiedenen molekularbiologischen Typisierungsmethoden**

#### **3.5.1. Verwandtschaftsgrad der Gruppe *C. albicans***

Studien- nr.	Herkunft	RAPD (RPO2)	Southern	Verwandt- schaftsgrad
(FG 28) (FG 29)	Landau	höchstwahr. höchstwahr.	wahrscheinlich wahrscheinlich	wahrscheinlich verwandt
(FG 119) (FG 120)	Memmingen	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. verwandt
FG 215 FG 217 FG 229	Bielefeld	höchstwahr. höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. verwandt
(FG 263/1) (FG 264) FG 265	Leipzig	höchstwahr. höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. verwandt
(FG 287) (FG 288)	Freiburg	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. verwandt
(FG 303) (FG 304)	Minden	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. verwandt
(FG 391) (FG 392)	Hannover	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. verwandt
(FG 449) (FG 450)	Saarlouis	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. verwandt

*Tabelle 13: Analyse des Verwandtschaftsgrads mittels unterschiedlicher Methoden durch visuellen Vergleich der Bandenmuster der C. albicans-Isolate; Einzelisolate sind nicht abgebildet; höchstw. verw. + wahrsch. verw. = wahrsch. verw.; höchstw. verw. + höchstw. verw. = höchstw. verw.; Legende: □ = Patienten einer Klinik, ( ) = mehrere Isolate eines Patienten von unterschiedlichen Isolationsorten.*

Anhand der Beurteilung der unterschiedlichen Methoden konnte der Verwandtschaftsgrad der einzelnen Isolate zueinander bestimmt werden. Im Vordergrund stand hierbei die Begutachtung des Verwandtschaftsgrads, wenn mehrere Isolate einer Klinik von unterschiedlichen oder vom selben Patienten zur Analyse vorlagen. In diesem Fall wurde anhand der Ergebnisse mit der jeweiligen Methode nach einem vorherrschenden Genotyp innerhalb der Klinik (bei Isolaten unterschiedlicher Patienten) bzw. nach einem einheitlichen Genotyp mehrerer Isolate eines Patienten

(Isolate verschiedener Körperregionen eines Patienten) gesucht. Anschließend wurden die anderen Isolate bzw. deren Genotypen dagegen verglichen. Einzelisolate (nur ein Isolat einer Klinik) wurden gegen alle anderen Genotypen der Spezies *C. albicans* verglichen. Die Ergebnisse beider Methoden wurden nach dem beschriebenen System (siehe Material und Methoden sowie Tabelle 13) ausgewertet und ergaben das jeweilige Verwandtschaftsverhältnis. In 16 Fällen waren die Isolate als „höchstwahrscheinlich verwandt“ anzusehen. In zwei Fällen lautete das Ergebnis der Analyse „wahrscheinlich verwandt“. Von 12 Einzelisolaten galten neun als „nicht verwandt“, zwei als „höchstwahrscheinlich“ und ein Isolat als „möglicherweise verwandt“. Die Verwandtschaftsverhältnisse der Einzelisolate sind jedoch eher als allgemein anzusehen, da nur ein allgemeiner Vergleich möglich war, und keinerlei Aussagen hinsichtlich der Epidemiologie oder Übertragungswege gemacht werden konnten.

Eine Besonderheit wiesen die Isolate „FG215“, „FG217“, „FG229“ aus Bielefeld auf. Alle drei Bielefelder Isolate stammten von unterschiedlichen Patienten, wiesen aber, bestätigt durch die molekularbiologische Typisierung, „höchstwahrscheinlich“ die selbe Genstruktur auf (siehe Abbildung 11/12). Ebenso verhielt es sich mit drei Isolaten aus Leipzig. „FG263/1“ und „FG264“ aus Leipzig waren Isolate eines Patienten. „FG265“ war ein Isolat eines weiteren Frühgeborenen dieser Klinik. Auch hier lag in allen drei Fällen, nach Bestimmung des Verwandtschaftsgrads, „höchstwahrscheinlich“ derselbe Genotyp vor.

Bei sieben Patienten, das zuvor genannte Leipziger Frühgeborene eingeschlossen, wurde *C. albicans* an zwei unterschiedlichen Orten isoliert. Nach Abschluss der Analyse mit beiden Methoden lag in sechs Fällen eine „höchstwahrscheinliche“ Verwandtschaft vor. Beide Isolate eines Patienten hatten dem zufolge ein identisches Bandenmuster. Nur einmal wurde der Verwandtschaftsgrad „wahrscheinlich verwandt“ konstatiert.

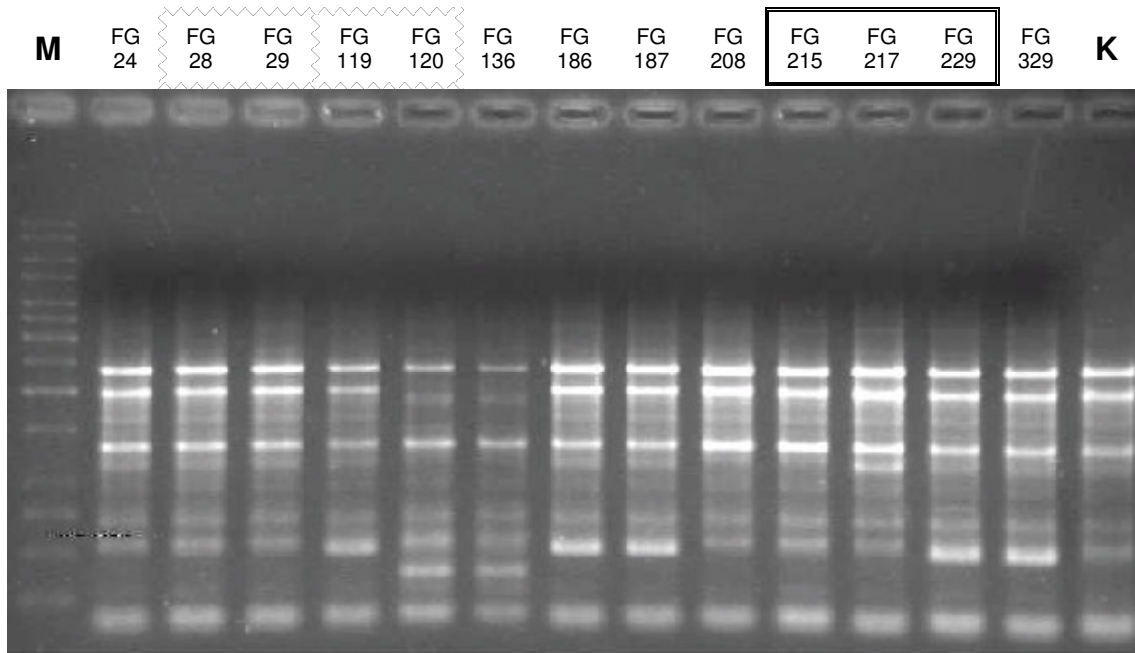


Abbildung 11: RAPD-PCR von *C. albicans*-Isolaten verschiedener Patienten; gewellte Umrandung = mehrere Isolate desselben Patienten unterschiedlicher Isolationsorte, doppelte Umrandung = Isolate verschiedener Patienten derselben Klinik, M = Molekularmarker, K = *C. albicans*-Kontrollstamm (ATTC 90028).

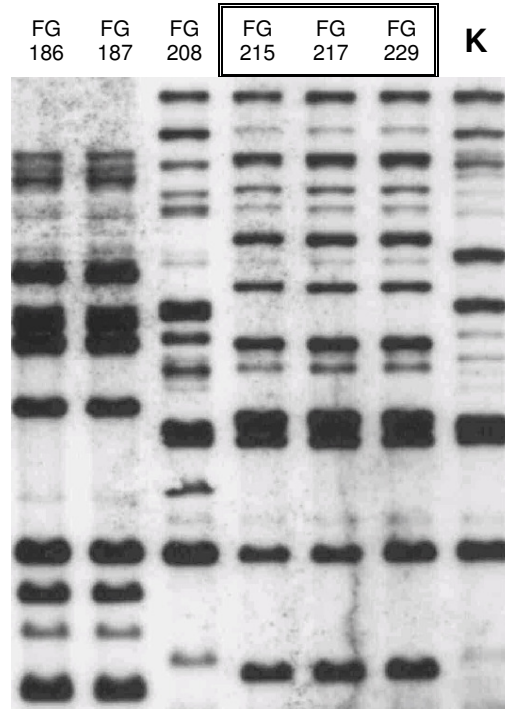


Abbildung 12: Southern-Blot von *C. albicans*-Isolaten verschiedener Patienten; doppelte Umrandung = Isolate verschiedener Patienten derselben Klinik, K = *C. albicans*-Kontrollstamm (ATTC 90028).

### 3.5.2. Verwandtschaftsgrad der Gruppe *C. parapsilosis*

Studien- nr.	Herkunft	RAPD (RPO2)	RAPD (RSD12)	IR-PCR	Verwandtschaftsgrad
FG 70 FG 71	Gelsenkirchen	höchstwahrsch.	wahrscheinlich	höchstwahrsch.	wahrscheinlich verwandt
FG 74 (FG 76) (FG 77)	Itzehoe	höchstwahrsch.	wahrscheinlich	höchstwahrsch.	wahrscheinlich verwandt
(FG 307) (FG 308) FG 312	Ludwigshafen	höchstwahrsch.	wahrscheinlich	höchstwahrsch.	wahrscheinlich verwandt

Tabelle 14: Analyse des Verwandtschaftsgrads mittels unterschiedlicher Methoden durch visuellen Vergleich der Bandenmuster der *C. parapsilosis*-Isolate; Einzelisolate sind nicht abgebildet; höchstw. verw. + wahrsch. verw. = wahrsch. verw.; Legende: □ = Patienten einer Klinik, ( ) = mehrere Isolate eines Patienten unterschiedlicher Isolationsorte.

Zur Beurteilung des Verwandtschaftsgrades wurde hier innerhalb einer Methode nach demselben Schema wie bei *C. albicans* verfahren. Einige Unterschiede ergaben sich hierbei durch die doppelte Durchführung der RAPD-PCR mit zwei unterschiedlichen Primern. Der Primer „RPO2“ wurde sowohl bei den Isolaten der Gruppe *C. albicans*, als auch bei *C. parapsilosis*, aufgrund seiner Unspezifität gegenüber allen *Candida*-Isolaten, eingesetzt. Hingegen wurde zur Typisierung von *C. parapsilosis*-Isolaten zusätzlich ein für diese Spezies spezifischer Primer „RSD12“ verwendet. Dies hatte zur Folge, dass das Schema zur Bewertung der Verwandtschaft mit den verschiedenen Methoden leicht abgewandelt wurde (siehe Material und Methoden).

In keinem der Fälle konnte eine „höchstwahrscheinliche“ Verwandtschaft festgestellt werden. Allerdings war bei Vorliegen mehrerer Isolate einer Klinik das Ergebnis immer eine „wahrscheinliche“ Verwandtschaft. Die Verwandtschaftsbeziehungen der Einzelisolate, durch visuellen Abgleich gegenüber den restlichen Genotypen, ergab in sechs Fällen ein „möglicherweise“ und einmal ein „nicht verwandt“. Wie bereits bei der Spezies *C. albicans* erwähnt, ist den Ergebnissen der Verwandtschaftsanalyse der Einzelisolate nur eine allgemeine Aussage zuzuschreiben.

Das Ergebnis spiegelt die Spezifität der einzelnen Methoden bzw. der Primer wider. Konnte innerhalb der RAPD mittels des Primers „RPO2“ noch eine hohe und stabile Bandenzahl generiert werden, und somit eine aussagekräftige Beurteilung hinsichtlich der Verwandtschaft gemacht werden, war dieses Ergebnis mit dem

speziesspezifischen Primer „RSD12“ nicht zu bestätigen. Das Verfahren der IR-PCR zeigte sogar in zwei Fällen keine Auswertbarkeit und besitzt somit eine geringe Aussagekraft.

Beim näheren Betrachten der Isolate „FG74“, „FG76“ und „FG77“ aus Itzehoe (FG 76 und FG77 = Isolate desselben Patienten) konnte in allen drei Fällen die Verwandtschaft als „wahrscheinlich“ angesehen werden (siehe Abbildung 13/14). Auch hier bestätigte sich die Beobachtung, die ebenso bei mehreren Isolaten derselben Klinik in der Spezies *C. albicans* aufgetreten ist, dass innerhalb einer Klinik ein einheitlicher Genotyp der Isolate vorliegt. Die Auswertung der Isolate „FG307“, „FG308“ und „FG312“ (FG307 und FG308 = Isolate desselben Patient) aus Ludwigshafen ergab denselben Sachverhalt.

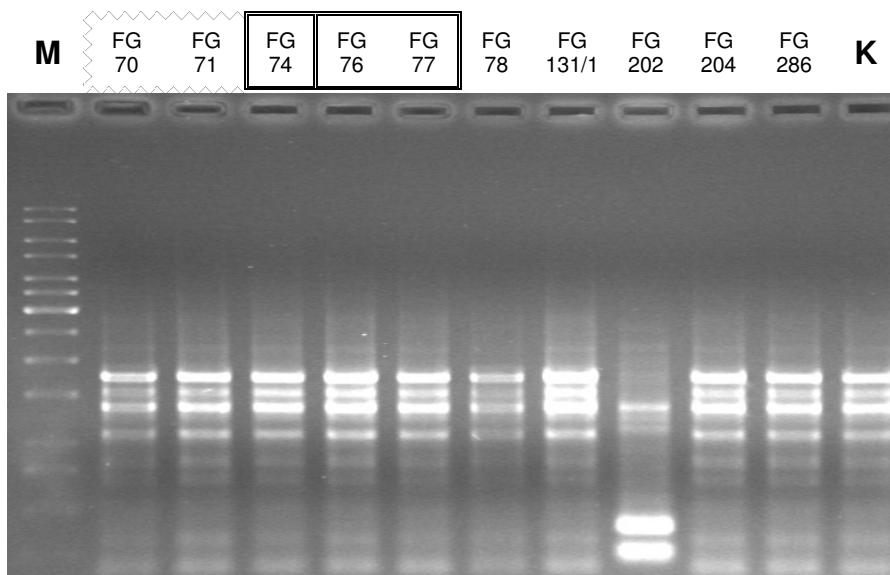


Abbildung 13: RAPD-PCR von *C. parapsilosis*-Isolaten verschiedener Patienten; gewellte Umrandung = mehrere Isolate desselben Patienten, doppelte Umrandung = verschiedene Patienten derselben Klinik (FG 76 und FG 77 sind Isolate desselben Patienten), K = *C. parapsilosis*-Kontrollstamm (ATTC 22013).

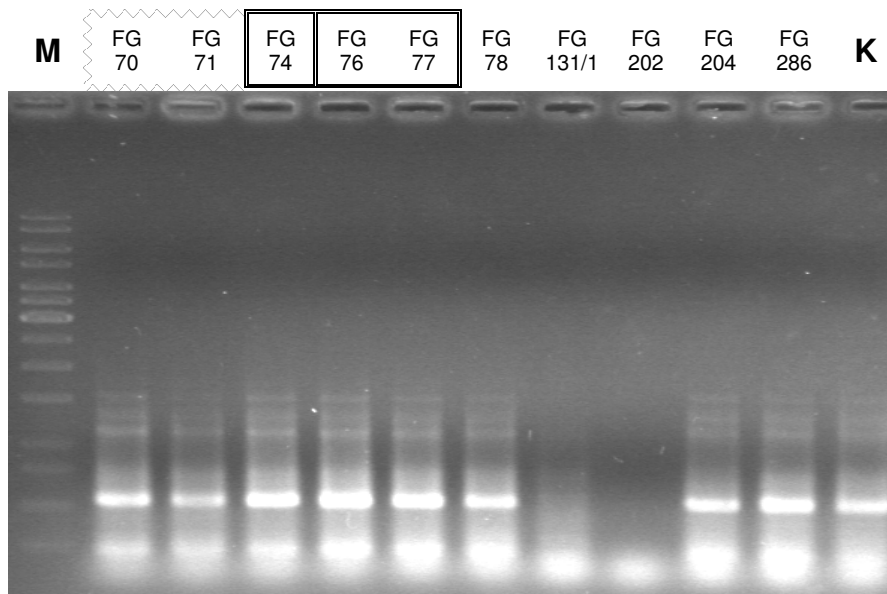


Abbildung 14: IR-PCR von *C. parapsilosis*-Isolaten verschiedener Patienten; gewellte Umrandung = mehrere Isolate desselben Patienten, doppelte Umrandung = verschiedene Patienten derselben Klinik (FG 76 und FG 77 sind Isolate desselben Patienten), K = *C. parapsilosis*-Kontrollstamm (ATTC 22013).

### 3.5.3. Verwandtschaftsgrad der Gruppe *C. lusitaniae*

Studien- nr.	Herkunft	RAPD (RPO2)	IR-PCR	Verwandtschaftsgrad
FG 628 FG 630	Kiel	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. nicht auswertbar	möglicherweise verwandt
FG 653 FG 656/2	Speyer	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. verwandt

Tabelle 15: Analyse des Verwandtschaftsgrads mittels unterschiedlicher Methoden durch visuellen Vergleich der Bandenmuster der *C. lusitaniae*-Isolate; Einzelisolate sind nicht abgebildet; höchstw. verw. + höchstw. verw. = höchstw. verw.; höchstw. verw. + nicht auswertbar = möglicherw. verw.; Legende: □ = Patienten einer Klinik.

Bei Vorliegen mehrerer Isolate aus Speyer konnte diesen ein „höchstwahrscheinlicher“ Verwandtschaftsgrad zugeordnet werden und somit Rückschlüsse auf eine gemeinsame Herkunft geschlossen werden (siehe Abbildung 15 und 16). Die Kieler Isolate jedoch wurden nur als „möglicherweise verwandt“ befunden, da die IR-PCR im Falle des Isolats FG630 kein verwertbares Ergebnis lieferte. Ein Einzelisolat galt als „möglicherweise verwandt“ mit den übrigen *C. lusitaniae*-Genotypen.

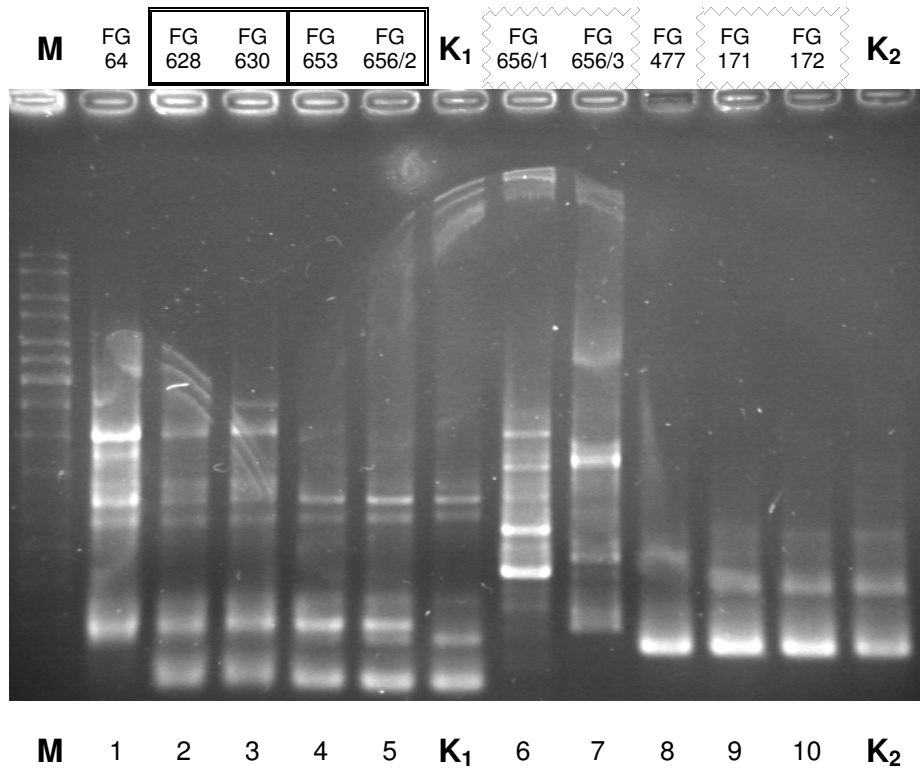


Abbildung 15: RAPD-PCR von *C. lusitaniae*-Isolaten (1-K<sub>1</sub>) und *C. guilliermondii*-Isolaten (6-K<sub>2</sub>) verschiedener Patienten; gewellte Umrandung = mehrere Isolate desselben Patienten unterschiedlicher Isolationsorte, doppelte Umrandung = verschiedene Patienten derselben Klinik, K<sub>1</sub> = *C. lusitaniae*-Kontrollstamm (CBS 5901), K<sub>2</sub> = *C. guilliermondii*-Kontrollstamm (CBS 1909).



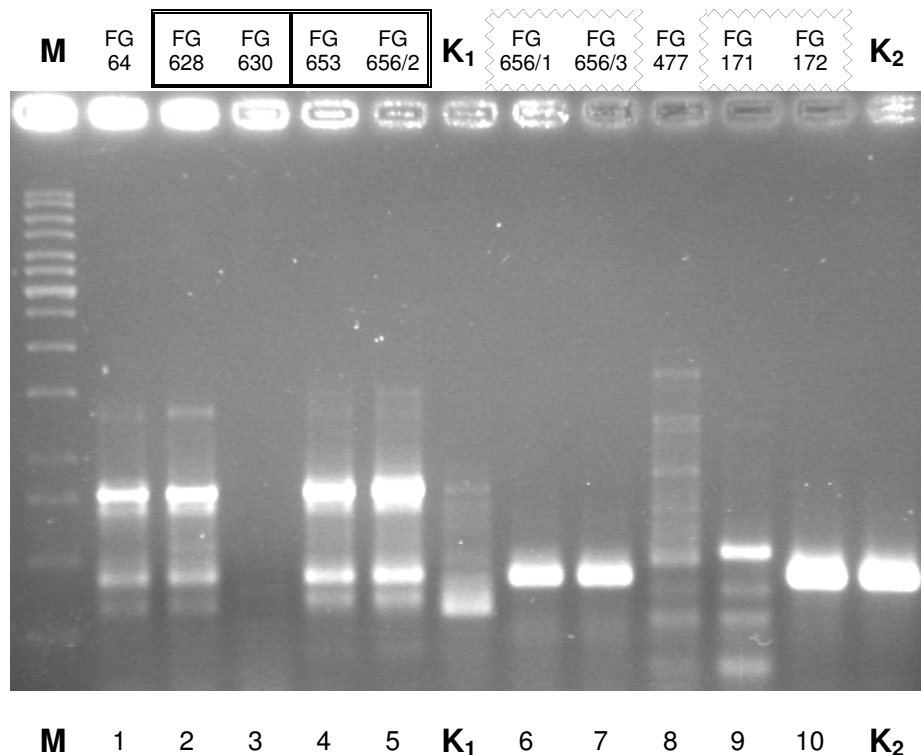


Abbildung 16: IR-PCR von *C. lusitaniae*-Isolaten (1-K<sub>1</sub>) und *C. guilliermondii*-Isolaten (6-K<sub>2</sub>) verschiedener Patienten; gewellte Umrandung = mehrere Isolate desselben Patienten unterschiedlicher Isolationsorte, doppelte Umrandung = verschiedene Patienten derselben Klinik, K<sub>1</sub> = *C. lusitaniae*-Kontrollstamm (CBS 5901), K<sub>2</sub> = *C. guilliermondii*-Kontrollstamm (CBS 1909).

### 3.5.4. Verwandtschaftsgrad der Gruppe *C. guilliermondii*

Studien-nr.	Herkunft	RAPD (RPO2)	IR-PCR	Verwandtschaftsgrad
(FG 171) (FG 172)	Greifswald	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. höchstwahr.	höchstwahr. verwandt
(FG 656/1) (FG 656/3)	Speyer	nicht verwandt nicht verwandt	höchstwahr. höchstwahr.	möglicherweise verwandt

Tabelle 16: Analyse des Verwandtschaftsgrads mittels unterschiedlicher Methoden durch visuellen Vergleich der Bandenmuster der *C. Guilliermondii*-Isolate; Einzelisolate sind nicht abgebildet; Legende: □ = Patienten einer Klinik, ( ) = mehrere Isolate eines Patienten unterschiedlicher Isolationsorte.

Mit Hilfe des von der Studienleitung festgelegten Schemas konnte bei zwei Isolaten eines Patienten („FG171“ und „FG172“) aus Greifswald eine „höchstwahrscheinliche“ Verwandtschaft bestätigt werden. Die beiden Isolate aus Speyer wiesen nur eine „möglicherweise“ Verwandtschaft auf (siehe Abbildung 15/16). Ein Einzelisolat galt

ebenso als „möglicherweise“ verwandt im Abgleich mit den übrigen *C. guilliermondii*-Isolaten.

### 3.5.5. Verwandtschaftsgrad der restlichen *Candida*-Isolate

Studien- nr.	Herkunft	Spezies	RAPD (RPO2)	IR-PCR	Verwandt- schaftsgrad
FG 506/2	Duisburg	<i>C. glabrata</i>	wahrscheinlich	nicht verwandt	möglicherweise verwandt
FG 633	Wiesbaden	<i>C. glabrata</i>	wahrscheinlich	nicht verwandt	möglicherweise verwandt
FG 343	Datteln	<i>C. krusei</i>	+	-	keine Auswertung

Tabelle 17: Analyse des Verwandtschaftsgrads mittels unterschiedlicher Methoden; Legende: „+“ = Unterscheidung von der Kontrolle, „-“ = keine Unterscheidung von der Kontrolle.

Bei den restlichen *Candida*-Isolaten lag nur eine geringe Isolatanzahl vor, was eine Verwertbarkeit ausschließt. Hinsichtlich der Auswertung innerhalb der Methoden wurde an den von der Studienleitung vorgenommenen Falldefinitionen festgehalten, und beide Isolate gegeneinander verglichen. Das Ergebnis der Auswertung bei den zwei Isolaten der Gruppe *C. glabrata* lässt nur auf eine „möglicherweise“ bestehende Verwandtschaft der Genotypen schließen. Bei dem einzigen *C. krusei*-Isolat wurde nur die Unterscheidung vom Kontrollstamm zur Auswertung der einzelnen Verfahren herangezogen.

## 4. Diskussion

Die moderne Intensivmedizin ermöglicht, dass immer mehr unreife Frühgeborene mit niedrigem (VLBW, Geburtsgewicht  $\leq 1500\text{g}$ ) und sehr niedrigem Geburtsgewicht (ELBW, Geburtsgewicht  $\leq 1000\text{g}$ ) überleben können. Dies hat zur Folge, dass Frühgeborene aufgrund ihres noch unreifen Immunsystems einer Reihe von möglichen Infektionen ausgesetzt sind, die bei normalgewichtigen Neugeborenen eher eine untergeordnete Rolle spielen. Neben der early und late onset B-Streptokokken-Infektionen gewinnt die neonatale *Candidiasis* bei unreifen Frühgeborenen immer mehr an Bedeutung [40]. Trotz verbesserter Betreuung der Neugeborenen ist die Mortalität bei Frühgeborenen mit systemischer *Candidiasis*, welche die Standardtherapie aus Amphotericin B und 5-Fluorocytosin erhalten, weiterhin mit 25-54% sehr hoch

{6,11,24,40,43,55}. In anderen Quellen rangieren die Mortalitätsraten mit 25-60% unter „low-birth-weight“ Frühgeborenen noch etwas höher {41,44,56,88}. Benjamin et al. {32} beschreiben eine Mortalitätsrate von 38% bei mit *Candida*-Spezies infizierten Patienten. Vergleicht man diese Zahlen mit denen, die Baley et al. aus dem Jahr 1984 mit 60-70% angeben {43}, wird eher eine Abnahme der Mortalität erkennbar. Bei anderen Autoren liegt die Mortalität mit 20-40% wesentlich unter der von 1984 {24,41,88}. Aufgrund der meist nicht vergleichbaren Studienergebnisse ist objektiv gesehen eher eine Zunahme der Mortalität aufgrund der immer unreiferen Frühgeborenen zu erkennen.

Obwohl die Bedeutung systemischer Pilzinfektionen auf Frühgeborenen-Intensivstationen zunehmend ist, ist dennoch wenig über deren Epidemiologie bekannt {57}. Vor allem in Bezug auf den Kolonisationsstatus und damit verbundenen Risikofaktoren fehlen Erhebungen. Die Angaben zur Inzidenz systemischer Pilzkrankungen variieren erheblich. So beschreibt Saiman {7} die Inzidenz als umgekehrt proportional zum Geburtsgewicht. Auch Stoll und Gordon et al. {89} sehen die Infektionsrate, v.a. bei late-onset-Sepsis durch gram-positive Erreger, aber auch durch Pilze, invers zum Geburtsgewicht. Huang et al. {52} legen die Inzidenz unabhängig von Gewichtsklassen eher allgemeiner auf 2-5% fest {39,40}. Etwas höher liegen die Inzidenzzahlen bei Baley et al. und Faix et al. mit 2-6% {3,39}. In einer anderen Studie erfolgte der Ausbruch der systemischen Infektion nach durchschnittlich 33 Tagen {43}. Mit einer Inzidenz von 5% liegen Rowen et al. {23} zwar im Mittelfeld, allerdings gehen sie davon aus, dass ein Zusammenhang zwischen der Dauer einer Antibiotikatherapie und der Kolonisation der Patienten besteht, eine darauf folgende Erkrankung an einer systemischen *Candida*-Infektion damit jedoch nicht korreliert. Genau dieser Zusammenhang wurde bei anderen Autoren diskutiert {39,41,43} und war auch Teil dieser Arbeit, sowie weitere Untersuchungen hinsichtlich des Kolonisationsstatus.

#### **4.1. Allgemeine Patientendaten am Abstrichtag**

##### Geschlechtsverteilung

Am Stichtag konnten 318 Frühgeborene in die Studie eingeschlossen werden. Die Stichprobe erwies sich als repräsentativ, da nahezu alle Bundesländer (mit Ausnahme von Sachsen-Anhalt), mit allen Stadt- und Unikliniken bzw. speziellen Perinatalzentren und ebenso beinahe alle Risikoschwangerschaften bzw. –geburten am Stichtag erfasst

wurden. Die Verteilung der Geschlechter war beinahe ausgeglichen, so lag sie mit 48,7% (n = 155) der männlichen Frühgeborenen etwas niedriger, als mit 51,3% (n = 163) bei den weiblichen Patienten. Campell et al. und Santos et al. {12,90} und verschiedene andere Autoren {59,91,92} konnten hingegen in ihren Studien eher eine geringe Überrepräsentierung des männlichen Geschlechts bemerken, die sich allerdings aufgrund geringer Fallzahlen als nicht signifikant erwies.

### Geburtsgewicht im Zusammenhang mit Besiedelung

Aufgrund des großen Patientenkollektivs konnten in den einzelnen Gewichtsklassen repräsentative Fallzahlen ermittelt werden. Somit konnten wir die These von Faix et al. und Baley et al. {3,39}, welche die Infektionsinzidenz in Abhängigkeit u.a. von der Kolonisation der Frühgeborenen mit *Candida*-Spezies sehen, in Korrelation mit der Kolonisationsrate in der jeweiligen Gewichtsklasse bringen. In der Gruppe „0-500g“ (n = 6) konnte in 50% (n = 3) der Fälle eine Kolonisation nachgewiesen werden. In der Gruppe der ELBW Frühgeborenen (n =126) waren 44 Patienten (Kolonisationsrate: 34,9%) besiedelt. Bei den insgesamt 316 VLBW konnte nur bei 28 Frühgeborenen (Kolonisationsrate: 22,6%) eine Besiedelung nachgewiesen werden. Vergleicht man unsere Kolonisationsraten mit denen von El-Mohandes et al. {93} so weichen diese voneinander ab. Dies kann einerseits durch das erheblich kleinere Patientenkollektiv (n = 82) bei El-Mohandes et. al und andererseits durch deren speziellen Isolationsort „Haut“ (retroaurikulär), welcher bei positiver Kolonisation im Zusammenhang mit einer vorausgegangenen rektalen Besiedelung gesehen wurde, bedingt sein.

Kolonisationsrate	< 1000g	< 1500g
<b>El-Mohandes et al. {93}</b>	24%	21%
<b>diese Studie</b>	34,9%	22,6%

*Tabelle 18: Vergleich der Kolonisationsraten in Bezug auf Gewichtsklassen. Unser Wert für Frühgeborene < 1000g beinhaltet auch die Gruppe „0-500g“.*

El-Mohandes et al. ordneten die Kolonisationsrate Gewichtsklassen zu: Dem zufolge waren 21% (13 von 61) der Patienten unter 1500g und sogar 24% (6 von 25) der Frühgeborenen unter 1000g besiedelt. Die höhere Kolonisationsrate der vorliegenden Studie bei den VLBW ist dadurch erklärbar, dass auch besiedelte Frühgeborene < 500g mit eingeschlossen sind.

Vergleicht man die Geburtsgewichte mit den in der Literatur erwähnten, wies das leichteste Frühgeborene der vorliegenden Studie mit einer gesicherten (positive Blutkultur) systemischen *Candidiasis* mit 490g ein weitaus niedrigeres Geburtsgewicht auf, als das leichteste von Melville et al. {51} (690g als geringstes mittleres Geburtsgewicht). Generell liegen die Geburtsgewichte dieser Studie im Rahmen der in der Literatur diskutierten Geburtsgewichte (zwischen 540g und 1400g) {20,22,23,24,38,51,59,63,90, 92,93,94,95}.

### Kolonisationsrate

Insgesamt bei 72 Frühgeborenen des Patientenkollektivs konnte am bundesweiten Abstrichtag eine Besiedelung mit einer oder mehreren Pilzspezies in verschiedenen Körperregionen nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Gesamt-Besiedelungsrate von 22,6%. Diese liegt etwas niedriger als die Kolonisationsrate von 26,7%, die Baley et al. {3} bei Frühgeborenen unter 1500g nachweisen konnten. In dessen Studie ergab sich eine Besiedelung bei 39 von 146 Patienten auf einer Neugeborenenintensivstation. Eine andere Situation beschrieben Rowen et al. {23}: Von 116 VLBW Frühgeborenen waren 34% (n = 39) Patienten einfach oder mehrfach endotracheal mit *Candida*-Spezies besiedelt. Allerdings lag in dieser Studie der Schwerpunkt auf dem Nachweis einer Kolonisation des Respirationstrakts. Eine Studie von Rangel-Frausto et al. {18} publizierte eine Kolonisationsrate von 30% in Bezug auf die Stuhlbesiedelung mit *Candida*-Spezies der insgesamt 2.847 Patienten. Anzumerken ist, dass ein Teil der Frühgeborenen zum Zeitpunkt der Überprüfung des Kolonisationsstatus bereits unter antimykotischer Therapie stand. Eine nähere Aufschlüsselung dieses Umstandes erfolgt unter „Antimykotika- und Antibiotikatherapie als Risikofaktoren“.

### Besiedelung bei Mehrlingen

Aufgrund unserer repräsentativen Patientenzahl in Perinatalzentren sowie Frühgeborenenintensivstationen sind allein 18,2% (n = 58) der Studienteilnehmer Mehrlingsgeburten. Zwar ist der Aufwärtstrend der Mehrlingsschwangerschaften weltweit zu bemerken, dennoch finden sich nur sehr wenige Informationen oder Studien über Mehrlingsinfektionen mit pilzlichen Erregern. Meist liegen diese wegen der geringen Fallzahlen in Form von „Case reports“ vor. So berichtet Schwesinger {96} über ein frühgeborenes Zwillingsspaar (26 SSW) mit einer disseminierten *Candidiasis*.

Bei beiden Zwillingen wurde eine systemische Infektion nachgewiesen, jedoch überlebte nur ein Kind. Des weiteren berichten Sood et al. {97} von einem Zwillingenpaar mit systemischer *Candidiasis*. Zwilling I erkrankte kurz nach der Geburt, wohingegen Zwilling II erst nach 26 Tagen Symptome der Dissemination zeigte. Auch hier gesundete nur ein Zwillingpartner (Zwilling II).

Genauere Zahlen über Besiedlungsraten bei Mehrlingen fehlen bis heute. In unserer Studie befanden sich fünf besiedelte frühgeborene Mehrlinge (8,6%), die insgesamt vier Zwillingenpaaren zugeordnet werden konnten. Hierbei ist anzumerken, dass nicht beide Partner des Paares besiedelt sein mussten. In einem Fall waren tatsächlich beide Zwillingenpartner besiedelt, wobei zusätzlich noch die selbe Pilzspezies nachgewiesen werden konnte (*Malassezia furfur*). Im Falle der drei restlichen Paare lag nur bei einem dazugehörigen Partner eine Besiedlung mit Pilzen vor (zweimal *C. albicans*, einmal *C. parapsilosis*).

Hinsichtlich der Zunahme von Mehrlingsschwangerschaften sollte diese Gruppe der Risikofrühgeborenen in Zukunft vermehrt Gegenstand von Studien über Kolonisationsraten und Infektionsentwicklung sein.

### Gestationsalter im Zusammenhang mit Besiedelung

Versucht man die Besiedelungsrate mit dem Gestationsalter der Frühgeborenen in Relation zu setzen, fällt auf, dass mit sinkendem Gestationsalter die Kolonisationsrate steigt. Auch Karlowicz et al. konnten dies zeigen {98}. Der Hauptanteil der besiedelten Patienten (n = 34 oder 47,2%) vorliegender Studie kam mit einem Gestationsalter von 24-27 SSW zur Welt. Die zweitgrößte Gruppe bildeten 31 kolonisierte Frühgeborene (43%) mit einem Gestationsalter von 28-31 SSW. Bei steigendem Entwicklungsalter nimmt die Besiedelungsrate ab. Somit zeigten nur noch 5 Frühgeborene (6,9%) bei einem Gestationsalter von 32-36 SSW eine Kolonisation. Die Kolonisationsrate von 2,7% lag bei einem Gestationsalter von 20-23 SSW sehr niedrig, erklärbar durch die geringe Patientenzahl mit diesem Entwicklungsalter. Somit kann eine Verbindung zu der Feststellung von Karlowicz et al. {98} geknüpft werden, in welcher allerdings vorwiegend ein Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter und einer *Candidiasis* diskutiert wurde. Sie stellten in ihrer Studie fest, dass mit einem Gestationsalter von 23-24 SSW > 35%, mit 25-26 SSW > 10%, mit 27-28 SSW ~ 5% und > 28 SSW kein Frühgeborenes eine *Candidiasis* aufgewiesen hat. In der Arbeit von El-Mohandes et al. {93} lag das mittlere Gestationsalter der kolonisierten Frühgeborenen bei  $28 \pm 0,8$

SSW, wohingegen sich das gemittelte Gestationsalter der nicht besiedelten Frühgeborenen bei  $30 \pm 0,4$  SSW bewegte. In der Studie von Kaufman et al. {95} über das Für und Wider einer antimykotischen Prophylaxe bei sehr unreifen Frühgeborenen, lag das Gestationsalter der zwei gebildeten Patientengruppen zwischen 25,5 SSW - 25,7 SSW. Vergleicht man nun diese Zahlen mit unseren Fällen der systemischen *Candida*-Infektion, fällt auf, dass in der Gruppe von 20-23 SSW ein Frühgeborenes, mit 24-27 SSW sechs Frühgeborene und weiterhin nur ein Patient in der Gruppe von 32-36 SSW zu verzeichnen waren, die eine systemische Pilzinfektion entwickelt haben. Wie bereits erwähnt muss die geringe Patientenanzahl in der Gruppe von 20-23 SSW berücksichtigt werden. Der bei Karlowicz et al. {98} gefundene Zusammenhang zwischen niedrigem Gestationsalter und Entwicklung einer *Candidiasis* kann mit Ausnahme der Gruppe von 20-23 SSW mit unseren Ergebnissen bestätigt werden.

### Geburtsmodus im Zusammenhang mit Besiedelung

Harms et al. {15} sahen eine Relation zwischen dem Geburtsmodus und der Kolonisation mit Pilzen. In ihrer Studie wurde eine Sectio-Rate von 88% erreicht, worauf sie die niedrige *Candida*-Kolonisation von 8,8% (37 von 422) zurückführten. Zudem kamen alle mukokutan kolonisierten Frühgeborenen per Spontangeburt (12%) zur Welt. Sie schlossen daraus, dass eine Vermeidung der Passage des Geburtskanals mit der möglichen peripartalen Aspiration von Hefezellen und späterer gastrointestinaler Besiedelung, zur Kolonisationsreduktion bei Frühgeborenen, sowohl mukokutan, als auch gastrointestinal führt. Bei Baley et al. {3} betrug die Kolonisationsrate 76,9% bei vaginal entbundenen Frühgeborenen, im Gegensatz zu 23,1% bei Kindern, die per Sectio zur Welt kamen. Dieser Unterschied kann in unseren Ergebnissen nicht widerspiegelt werden. Von 318 Patienten wurden 282 (88,7%) per sectio geboren, wovon bei 62 (21,9%) eine Besiedelung festgestellt wurde. 36 (11,3%) wurden spontan entbunden. Hier wurde eine Kolonisation bei 10 (27,7%) nachgewiesen. Auch bei El-Mohandes et al. {93} fand sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Geburtsmodus. Der sich angeblich auf die Infektionsentstehung negativ auswirkende Einfluss der vaginalen Spontangeburt oder gar die Bewertung als ein zusätzlicher Risikofaktor kann durch unsere Ergebnisse nicht mitgetragen werden. Die Tatsache, dass derart unreife Frühgeborene meistens per Sectio entbunden werden, spiegeln auch unsere unzureichenden Daten hinsichtlich der Risikobeurteilung der vaginalen Entbindung wider. Daher sind Aussagen in Bezug auf

den Zusammenhang zwischen Geburtsmodus und Kolonisation in dieser Studie als nicht repräsentativ zu bewerten.

### Erregerspektrum

Als wichtigste systemische Pilzinfektion auf der Frühgeborenenintensivstation wird mehrheitlich die *Candidiasis* genannt {55,65}, die am häufigsten durch *C. albicans* {6,7,40,41} hervorgerufen wird. Jedoch steigt die Anzahl der *Candidiasis*, die durch non-*albicans Candida* spp., wie *C. parapsilosis*, verursacht werden vor allem bei Frühgeborenen {11,24,91} stark an. Meist steht dies im Zusammenhang mit langen Liegezeiten von zentralen Venenkathetern {25}. Wie bereits erwähnt wird in zunehmender Zahl, nämlich in 15% der Fälle einer neonatalen *Candidiasis*, *C. parapsilosis* als Erreger isoliert {7,24,37,64}. Eher seltener wurde auch *C. tropicalis* als Ursache der *Candidiasis* gefunden {3,35,99}. Die ehemals als apathogen angesehene Hefe *C. glabrata* {19} wurde Ende der 70er Jahre als Erreger opportunistischer Infektionen entdeckt {6,43}. In der ESPED-Studie {64} dominierte die Gruppe der *C. albicans*-Isolate vor der Gruppe der non-*albicans*-Spezies. Jedoch stellte hier *C. parapsilosis* mit 46% den häufigsten Vertreter dar, gefolgt von *C. tropicalis* und *C. glabrata* mit je 15%.

Unsere Ergebnisse bestätigten die Dominanz der *Candida*-Spezies bei der Besiedelung von Risikofrühgeborenen. Mit insgesamt 58 *Candida*-Isolaten verschiedener Spezies stellten sie die Haupterregergruppe dar, die am bundesweiten Abstrichtag isoliert wurde. Mehrfachbesiedelungen in unterschiedlichen Körperregionen mit demselben Keim wurden jeweils einfach gewertet. Ebenso fanden sich bei sieben, der im Follow-up-Intervall diagnostizierten acht systemischen Infektionen, *Candida*-Spezies als verursachende Keime. In einem Fall konnten nur „Hefen“ als Erreger identifiziert werden. Bei der Speziesidentifikation bildete *C. albicans* mit 30 Isolaten die größte Gruppe. Literaturangaben zu Folge rangieren Isolationsraten für *C. albicans* zwischen 22-96%. Unsere Ergebnisse liegen hier mit 51,7% im oberen Mittel {3,12,20,22,23,32,40,41,90,91,92,94,95,100,101,102,103,104,105}. Mit 15 Isolaten rangierte *C. parapsilosis* an zweiter Stelle. In vielen Literaturstellen liegen Häufigkeitsverteilungen dieser Spezies zwischen 10-77,8% {3,12,20,22,23,32,41,59,90,91,92,93,94,95,99,101,102,103,104,105,106,107}. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lagen mit 25,8% im unteren Niveau. Andere Autoren hingegen bemerken, dass *C. parapsilosis* die Dominanz von *C. albicans* verdrängen



wird {11}. Anhand unserer Kolonisationsraten können wir diese Tendenz nicht bestätigen.

Folgende Tabelle spiegelt die Erregerverteilung von *Candida*-Spezies in verschiedenen Studien in Bezug auf die einfache Kolonisation von Frühgeborenen wider und nicht bei einer *Candidiasis*:

Isolierte Spezies	C. alb.	C. para.	C. guill.	C. glab.	C. lusi.	C. krus.	C. trop.
Rowen et al. {67}	73%	-	-	-	-	-	-
Baley et al. {69}	61,5%	17,9%	-	-	-	-	7,7%
El-Mohandes et al. {93}	44%	56%	-	-	-	-	-
diese Studie	51,7%	25,8%	8,6%	8,6%	3,4%	1,7%	-

Tabelle 19: Angaben verschiedener Autoren zur Häufigkeit der einzelnen *Candida*-Spezies. *C. alb* = *C. albicans*, *C. para.* = *C. parapsilosis*, *C. guill.* = *C. guilliermondii*, *C. glab.* = *C. glabrata*, *C. lusi.* = *C. lusitaniae*, *C. krus.* = *C. krusei*, *C. trop.* = *C. tropicalis*.

Wie bereits erwähnt wird eine generelle Wende von *C. albicans* zu non-*albicans* *Candida*-Spezies beschrieben {11,91}. Jedoch lagen unsere Ergebnisse der Isolationsraten bei *C. albicans* doppelt so hoch wie bei *C. parapsilosis*. Stellt man aber die Zahl der *C. albicans*-Isolate (n = 30) denen der non-*albicans*-Isolate (n = 28) gegenüber, so scheint das Verhältnis beinahe ausgeglichen und ein Shift in Richtung non-*albicans*-Spezies erkennbar. Die Häufigkeitsraten für *C. glabrata* liegen je nach Autor bzw. Studie bei 1,6-10,3%, für *C. lusitaniae* zwischen 1,6-10%, für *C. guilliermondii* bei 0,8-16,7%, für *C. krusei* 2-8,7% und für *C. tropicalis* zwischen 2,4-15% {3,12,22,23,32,41,59,90,92,95,100,101,107,108,109,110,111}. Unsere Isolationsraten lagen bei *C. guilliermondii* (n = 5) mit 8,6%, bei *C. lusitaniae* (n = 5) ebenfalls mit 8,6%, bei *C. glabrata* (n = 2) mit 3,4% und bei *C. krusei* (n = 1) mit 1,7% innerhalb dieser publizierten Daten. Zu anderen *Candida*-Spezies konnten keine Daten erhoben werden.

Neben *Candida*-Spezies bildeten *Malassezia*-Spezies mit 27 Isolaten die nächst größere Gruppe. Rowen et al. {23} berichteten über eine Häufigkeitsrate dieser Pilz-Spezies von 17,6%, welche in unseren Untersuchungen mit einer Isolationsrate von 29,6% deutlich höher liegt. Andere Literaturstellen geben Kolonisationsraten für *Malassezia* zwischen 35-91% an {112}.

### Antimykotika- und Antibiotikatherapie als Risikofaktoren

In der Literatur sind zahlreiche Risikofaktoren beschrieben, die bereits ausführlich erwähnt wurden. Diese Studie beschränkte sich darauf diese Risikofaktoren allgemein im Formblatt 2 abzufragen. Die Situation der Frühgeborenen mit einer systemischen Infektion wird später dargestellt. Als einen bedeutenden Faktor in der Entstehung einer systemischen *Candida*-Infektion sehen viele Autoren die Therapie mit Breitspektrum-Antibiotika {65,37,38,41,3,112,7}. Oftmals ist eine solche Therapie indiziert, da die Patienten gleichzeitig antimykotisch behandelt werden, weil zum Beispiel eine pilzliche Besiedelung oder Infektion vorliegt. Die Antibiotikatherapie stellt somit eine prophylaktische Gabe gegen bakterielle Infektionen dar. Dennoch wirkt sich diese Kombinationstherapie begünstigend auf die Kolonisation und eine Änderung des Resistenzverhaltens aus. Unsere Ergebnisse zeigen, dass von 318 Frühgeborenen insgesamt 151 eine prophylaktische oder therapeutische antibiotische Therapie erhalten haben. Eine gleichzeitige Kolonisation wiesen aber nur 53 (35%) auf, und in 98 (64,9%) Fällen konnte keine Kolonisation nachgewiesen werden. Zur Ergänzung muss erwähnt werden, dass die Antibiotikaphylaxe als solche, im Formblatt 2 nicht dezidiert erfragt wurde, sondern nur nach einer allgemeinen Antibiotika-Therapie gefragt war. Unsere Auswertung zeigte eine Signifikanz zwischen einer Antibiotikagabe und einem positiven Kolonisationsstatus ( $p < 0,001$ ), weshalb eine Antibiotikatherapie, egal ob prophylaktisch oder therapeutisch verabreicht, generell als Risikofaktor angesehen werden muss. Hinsichtlich der Auswertung zur alleinigen Antimykotika-Therapie verhielt es sich ähnlich wie mit der Antibiotika-Gabe, allerdings wurde hier im Formblatt 2 dezidiert nach der Indikation gefragt. Insgesamt 84 (26,4%) Frühgeborene wurden antimykotisch behandelt, worunter sich wiederum nur 16 (19,1%) besiedelte befanden. Dahingegen blieben 56 (23,9%) ebenfalls kolonisierte Frühgeborene unbehandelt. Somit erhielten 68 (80,9%) Patienten, die keine pilzlichen Erreger aufwiesen, eine antimykotische Prophylaxe, die sich bei 56 Frühgeborenen auf die alleinige topische Therapie beschränkte. Jedoch in neun Fällen wurde eine systemische und bei drei Patienten ein Kombinationstherapie aus systemischem und lokalem Antimykotikum gewählt. Von den 16 besiedelten Frühgeborenen erhielten insgesamt 13 Frühgeborene eine rein topische Anwendung der Antimykotika. In zwei Fällen kamen nur systemisch wirkende Substanzen zum Einsatz. Ein Frühgeborenes erhielt eine Kombination aus beidem.

Hinsichtlich der Indikation wurde in 62 Fällen eine prophylaktische Gabe angegeben, wodurch die hohe Behandlungsrate unbesiedelter Kinder zum Teil erklärbar wird. Der Verdacht auf Pilzinfektion (n = 2) führte in zwei Fällen zur empirischen Therapie der möglichen Pilzinfektion. Des weiteren wurden als Indikationen angegeben: Amnioninfektionssyndrom (n = 2), Soordermatitis (n = 2), nekrotisierende Enterocolitis (n = 2), bronchopulmonale Dysplasie (n = 2), vaginale Pilzinfektion der Mutter (n = 2), unter Kortikosteroidtherapie (n = 2) und Sepsis (n = 1). Betrachtet man sich die Daten hinsichtlich einer gleichzeitigen Antibiotika- und Antimykotika-Therapie, stellt man fest, dass auch in diesem Fall oft vom Einsatz dieser Kombinationstherapie trotz geringer Besiedelungsrate Gebrauch gemacht wird. 56 Patienten wurden gleichzeitig antibiotisch und antimykotisch behandelt, worunter sich aber nur 12 (21,4%) der mit *Candida*-Spezies besiedelten Frühgeborenen befanden.

Aus diesen Angaben kann man schließen, dass die Entscheidung über den Einsatz von hochpotenten Pharmaka in manchen Fällen eventuell vorschnell und ohne die genaue Kenntnis einer etwaigen Kolonisation getroffen wird, und die prophylaktische Gabe von Antimykotika bei Hochrisikopatienten oftmals einen etablierten Standard darstellt. Hierbei ist aber nicht zu vernachlässigen, dass gerade bei den Hochrisiko-Frühgeborenen kein Entscheidungsspielraum zum Abwägen des Für und Widers eines Einsatzes von Antibiotika oder Antimykotika bleibt. Dennoch wird der Einsatz einer prophylaktischen Gabe von antimykotischen Substanzen in der Literatur stark diskutiert. Sims et al. {113} verabreichten 33 Frühgeborenen (< 1250g) alle acht Stunden 1 ml (100,000 units/ml) Nystatin bis eine Woche nach Extubation. Verglichen mit der Kontrollgruppe (n = 34; < 1250g) sank die Kolonisationsinzidenz auf 12% im Gegensatz zu 44% in der Kontrollgruppe, die kein Nystatin erhielten. Auch hinsichtlich des Auftretens invasiver Pilzkrankungen sank die Zahl auf 6% versus 32% in der Kontrollgruppe. Konträr hierzu ist die Meinung von Johnson et al. und Faix et al. {39,55}, die durch eine orale Nystatin-Prophylaxe keine Verhinderung einer systemischen Erkrankung sehen. Von fünf der Frühgeborenen bei Johnson et al. {55} wurden vier von Geburt an mit Nystatin (oral) behandelt, und entwickelten dennoch eine systemische Infektion. Auch bei Baley et al. {3} sank die Inzidenz der *Candidiasis* bei VLBW trotz Nystatin-Prophylaxe nicht unter 3%. Neben der Nystatin-Prophylaxe steht nun mehr und mehr eine prophylaktische Behandlung mit Fluconazol im Fokus der Experten. Auch hier werden unterschiedliche Meinungen in der Literatur vertreten. Kaufman et al. {95} zeigten, dass eine Fluconazol-Prophylaxe während der ersten sechs Lebenswochen, effektiv genug zur Vorbeugung der Pilzbesiedelung und der

Entwicklung einer invasiven Pilzinfektion bei „extremely-low-birth-weight-infants“ ist. Des Weiteren konnte in dieser Untersuchung keine Entstehung von Resistenzen beobachtet werden. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Autoren dieser Studie schon bei einer positiven Urinkultur die Diagnose einer systemischen Pilzinfektion stellten. Positive Urinbefunde und besonders Beutelurine sind daher aufgrund der Kontaminationsgefahr durch Hautbesiedelung kritisch zu bewerten. Dies hat zur Folge, dass die Zahlen der systemischen Infektion der Kaufman-Studie {95} in der Kontrollgruppe mit dem Placebo deutlich höher zu liegen scheinen. Auch konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied in der Mortalität zwischen der Fluconazol- und Placebogruppe ermittelt werden. Neely und Schreiber {114} vermuten, dass beim Einsatz einer allgemeinen Fluconazol-Prophylaxe bei VLBW die ohnehin schon schlechte Resistenzlage auf Kindersäuglingsstationen verschlechtert wird. Sie verweisen auf die Studie von Kicklighter et al. {27}, in welcher die Effektivität einer Fluconazol-Prophylaxe hinsichtlich der Reduzierung der rektalen Kolonisation mit *Candida*-Spezies bei VLBW untersucht wurde. Zwar wurde deutlich, dass mit Hilfe der Prophylaxe die Kolonisationsrate in der Fluconazol-Gruppe (n = 53) auf 15,1% versus 46% in der Placebo-Gruppe (n = 50) gesenkt wurde, hinsichtlich der Daten zur Entwicklung einer systemischen *Candida*-Infektion, mit jeweils zweier „Outbreaks“ in beiden Gruppen, keine Unterschiede gefunden wurden. Aufgrund der geringen Fallzahl wurden keine Veränderungen in den MHK- und Resistenzdaten beobachtet. Zwar gestanden Neely und Schreiber {114} der Prophylaxe eine Reduzierung der Kolonisation zu, dennoch konnte ihrer Meinung zufolge keine klinische Signifikanz bewiesen werden. Daher sehen beide keine Rechtfertigung für den Einsatz einer breiten Fluconazol-Prophylaxe bei VLBW. Auch Saiman {7} äußert sich in ihrer Arbeit zum Einsatz einer Prophylaxe mit Fluconazol kritisch. Sie konnte einen Rückgang im Auftreten von systemischen Pilzinfektionen, jedoch keine signifikante Reduzierung der Mortalität verzeichnen.

Anhand der Ergebnisse dieser Studie und nach Vergleich der diskutierten Literatur sehen auch wir die breite Gabe einer systemischen antimykotischen Prophylaxe als kritisch an. Neben fehlenden einheitlichen neonatologischen Falldefinitionen zur Einteilung systemischer Pilzinfektionen erschwert darüber hinaus die zunehmende Veränderung der antimykotischen Empfindlichkeit ein generelles Pro oder Contra zur Antimykotikaprophylaxe. Zunächst sollten einheitliche Falldefinitionen erarbeitet werden und anhand dieser, jeder einzelne Fall hinsichtlich der individuellen Patientensituation, auf eine nötige vorsorgliche Antimykotikagabe abgewägt werden.

Hinsichtlich der ELBW ist die Überlegung für den Einsatz einer generellen Antimykotika-Prophylaxe bzw. den Beginn einer empirischen Therapie bei Nachweis einer Kolonisation an mindestens zwei Isolationsorten zu erwägen.

### Parenterale Ernährung im Zusammenhang mit Besiedelung

Auch die parenterale Ernährung der Frühgeborenen wird allgemein als prädisponierender Faktor bei der Entstehung invasiver Pilzerkrankungen angesehen {34,38,93,100,115}. Gerade die lipophile Hefe *Malassezia*, die in unserer Arbeit als Nebenbefund zahlreich (n = 27) isoliert wurde, sieht in den Fettemulsionen {112} und Glucoselösungen, die u.a. als Nahrungersatzmittel verabreicht werden, ein optimales Milieu sich zu vermehren. Doch auch *Candida*-Spezies finden hiermit hervorragende Wachstumsbedingungen vor. Des weiteren begünstigt der fehlende Kontakt des Gastrointestinaltrakts mit Nahrung die Vermehrung von Pilzen verschiedener Spezies. Die Daten unserer Studie scheinen diese These zu bestätigen. Von 72 mit *Candida*-Spezies kolonisierten Patienten wurden 48 (66,7%) Frühgeborene parenteral ernährt. Von den übrigen 246 Patienten, die keine *Candida*-Besiedelung aufwiesen, wurden 113 (45,9%) parenteral ernährt. Hiermit besteht ein signifikanter Zusammenhang (p = 0,002) zwischen der parenteralen Ernährung und einer Kolonisation mit *Candida*-Spezies. Insgesamt konnten bei allen parenteral ernährten Patienten 31-mal *Candida*-Spezies und in 13 Fällen *Malassezia furfur* isoliert werden, jedoch trat keine einzige systemische Infektion durch *Malassezia*-Spezies verursacht auf, daher bleibt die pathogenetische Bedeutung des Erregers weiterhin unklar.

Betrachtet man die parenterale Ernährung der Frühgeborenen im Zusammenhang mit der möglichen Entstehung einer invasiven Pilzinfektion wird in der Literatur hier eine signifikante Assoziation beider Aspekte diskutiert. Bei verschiedenen Autoren finden sich bei Frühgeborenen mit einer *Candidiasis* bei 60-100% eine totale parenterale Ernährung {21,24,38,42,52,91,93,100,109,108,115}. Kontrovers hierzu fand sich bei Müller und Elstner et al. zur Untersuchung von Pilzinfektionen auf deutschen Frühgeborenenintensivstationen im Rahmen der ESPED-Studie {64} kein signifikanter Zusammenhang (p = 0,226) zwischen der parenteralen Ernährungssituation und einer späteren invasiven Infektion bzw. Mortalität. In der vorliegenden Studie lag bei allen acht Fällen mit späterer *Candidiasis* eine parenterale Ernährungssituation vor, jedoch wiesen nur vier der Patienten am Stichtag eine Kolonisation mit pilzlichen Erregern auf. Deshalb können nur bedingt Rückschlüsse auf die Korrelation der Ernährungssituation

mit der Entstehung einer systemischen Pilzinfektion gezogen werden. Zusätzlich stellen die acht Fälle der *Candidiasis* nur ein kleines Patientenkollektiv dar.

### Besiedelungs- und Lokalisationsorte

Van den Anker et al. [35] beschrieben als Hauptbesiedlungsorte mit *Candida*-Spezies den Gastrointestinaltrakt, den Respirationstrakt bzw. die Haut. Auch andere Autoren konstatierten bei 18-34% der Frühgeborenen eine Kolonisation des Gastrointestinaltrakts [7]. Unsere Studienergebnisse stehen hiermit im Einklang. Als Hauptisolationsort steht mit 37 *Candida*-Isolaten (63,7%) der Gastrointestinaltrakt an vorderster Stelle. Hierbei darf allerdings nicht unbemerkt bleiben, dass *Candida*-Spezies zuweilen als Kommensale des menschlichen Magen-Darm-Trakts zu finden sind, so dass sie bei Frühgeborenen mit insuffizienter Abwehrlage als potentielle Infektionsquelle zu werten sind. Findet zudem eine Besiedelung des Respirationstraktes statt, ist oftmals mit einer späteren Invasion bzw. einer hohen Pilzlast zu rechnen [7,23]. Auch unsere Studie bestätigt eine bevorzugte Besiedelung des Respirationstraktes. Bei Zusammennahme der oropharyngeal (n = 19) und tracheal, das heißt aus Trachealsekret, (n = 2) isolierten *Candida*-Spezies fanden sich 36,2% der Isolate im Respirationstrakt. Betrachtet man das Ergebnis der aus dem Trachealsekret isolierten Spezies separat, weichen unsere Werte (3,4%) von denen in der Literatur publizierten, die sich zwischen 24,1-53,3% bewegen, ab [3,24,64]. Allerdings verhalten sich unsere Ergebnisse im Zusammenhang der Isolationsorte bei systemischen Infektionen mit den vorher genannten Werten konform, worauf aber später noch intensiver eingegangen wird.

Darüber hinaus werden zahlreiche andere Isolationsorte für *Candida*-Spezies beschrieben. Allerdings beschränkte sich unsere Studie vorwiegend auf die Untersuchung der Hauptisolationsorte wie Gastrointestinal- und Respirationstrakt.

## **4.2. Systemische Infektionen im Follow-up-Intervall (Formblatt 3/4)**

Nach sechs (30.07.2001) Wochen fand eine erneute Datenerhebung, das sogenannte Follow-up statt. Es diente zur Feststellung der Zahlen hinsichtlich der Entlassungen, Hospitalisation, Sterberate und aufgetretenen systemischen Infektionen bei den teilnehmenden Patienten. Insgesamt waren bis zu diesem Zeitpunkt 15 (4,7%)

Frühgeborene verstorben, ohne dass bekannt wurde, ob eine Pilzinfektion ursächlich war. Betrachtet man nun die Zahlen innerhalb der Gewichtsgruppen wird auch hier wieder deutlich, dass die Sterblichkeit stark mit dem Geburtsgewicht assoziiert ist. Somit starben vier (66,6%) von sechs Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 500g, die beiden überlebenden waren nach 60 Tagen immer noch hospitalisiert. Sechs (4,9%) der 120 Frühgeborenen in der Gewichtsgruppe „501-1000g“ überlebten nicht. Der Großteil dieser Gruppe, insgesamt 62 Patienten, befand sich allerdings noch in stationärer Behandlung, wohingegen 53 Frühgeborene schon entlassen waren. Die größte Patientenzahl befand sich in der dritten Gruppe (n = 190) mit einem ursprünglichen Geburtsgewicht von „1001-1500g“. Hierunter wurden fünf (2,6%) Todesfälle, 169 Entlassungen und fünf weiterhin hospitalisierte Patienten verzeichnet. Insgesamt konnten 224 (70,4%) Patienten während des Follow-up-Intervalls nach Hause entlassen werden. Von allen Patienten erkrankten 2,5% an einer systemischen Infektion. Eine Assoziation des Kolonisationsstatus am Abstrichtag mit der Entwicklung einer späteren Infektion im Follow-up zeigt, dass 5,5% (n = 4) der am Abstrichtag besiedelten Patienten (n = 72) eine systemische Pilzinfektion entwickelte. So sprachen Huang et al. {91} in ihrer Studie „very-low-birth-weight-infants“ ein erhöhtes Risiko für den Erwerb einer *Candidiasis* zu, wenn sie während der ersten Lebenswoche besiedelt sind. Singh et al. {116} beschrieben in ihrer Studie eine Kolonisationsrate von 71,4% der insgesamt 70 Frühgeborenen (Isolationsorte: oropharyngeal, umbilikal, inguinal, rektal). Die Infektionsrate lag mit 22,8% deutlich höher als unsere, wobei auch hier erneut unterschiedliche Definitionen und Isolationsorte bei systemischen Pilzinfektionen eine Rolle spielen. Saiman et al. {14} konnte bei 43% der Patienten mit späterer *Candidiasis* eine vorherige gastrointestinale Kolonisation nachweisen. Bei Baley et al. {3} lag die Kolonisationsrate bei 26,7%. Auch hier orientierte sich die Infektionsrate am vorherigen Kolonisationsstatus.

Es muss hinzugefügt werden, dass diese Daten nur den Standpunkt zum Follow-up-Termin widerspiegeln. Ein möglicher Anstieg der Sterbefälle und systemischen Infektionen nach diesem Zeitpunkt ist aufgrund der risikobehafteten Situation der Frühgeborenen allerdings möglich. Weiterhin wurde im Fragebogen 3 nicht dezidiert nach den Todesursachen gefragt und es lagen keine Obduktionsergebnisse vor. Daher bleibt unklar, ob die Frühgeborenen tatsächlich an einer Pilzinfektion verstorben sind. Alleine das Auftreten von invasiven Pilzerkrankungen musste gemeldet und das Formblatt 4 (Systemische Pilzinfektionen) zusätzlich ausgefüllt werden. Die zurück gesendeten Formblätter der Kliniken aus dem Follow-up-Intervall ergaben acht Fälle

einer systemischen Pilzinfektion, in zwei Fällen konnte der Verdacht auf eine systemische Infektion, wegen fehlendem Erregernachweis nicht aufrechterhalten werden.

Da nur wenige grosse Studien bisher auf diesem Fachgebiet existieren, sind nur geringe publizierte Daten zu finden, die dieser Studie in ihrem grossen repräsentativen Umfang (repräsentatives Patientenkollektiv, Follow-up) entsprechen, und zeigt, dass noch erhebliche Wissensdefizite bestehen.

#### **4.2.1. Isolationsorte bei systemischer Infektion**

In der Literatur werden unterschiedliche Häufigkeiten zu den Isolationsorten der Erreger bei invasiven Pilzerkrankungen angegeben. So gaben Johnson et al. {55} bei einer *Candidämie*, im Falle von „very-low-birth-weight-infants“, den Liquor mit 52%, Urin mit 48% und Blut mit 45% als häufigste Isolationsorte an. Darüberhinaus konnten sie Erreger durch längere Kultur oder nach dem Tod aus Knochen/Gelenken (26%), Augen (23%), Lunge (13%), Hautabszessen (10%), Herz (6%) und Peritoneum (3%) isolieren. In der vorliegenden Studie sind die Hauptisolationsorte der Erreger bei einer systemischen Pilzinfektion positive Urinkulturen (n = 4) (meist Beutelurine) und Zentrale-Venenkatheter-Spitzen (n = 4). Darauf folgen Isolationsorte wie Trachealsekret (n = 2), positive Blutkulturen (n = 1), Magensaft (n = 1) und ein Hautabstrich (n = 1). Es muss Erwähnung finden, dass diese Studie eine reine Kolonisationsstudie war, jedoch im Follow-up nach den Isolationsorten bei *Candidiasis* gefragt wurde. Eine multifokale Besiedelung wie bei Johnson et al. {55} sowie in der Vorgängerstudie zur Untersuchung von systemischen Pilzinfektionen auf Neugeborenenintensivstationen im Rahmen der ESPED (Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland) von Müller und Elstner et al. {64} in 65% der Fälle beschrieben, lag auch in unserer Studie bei 50% (n = 4) der systemischen Infektionen vor. Anhand dieser Verteilung spiegelt sich die Bevorzugung des Urogenitaltraktes von *Candida*-Spezies wider {96,117,118}. Allerdings lagen die Isolationsraten für *Candida*-Spezies anderer Autoren niedriger als die unseren. Sastre et al. {104} berichten von 28%, für aus dem Urin isolierte *Candida*-Spezies, Johnson et al. {55} nennt den Urin als zweithäufigsten Isolationsort mit 48%. Zentrale-Venenkatheter-Spitzen und Blut stellen in verschiedenen publizierten Ergebnissen die Hauptisolationsorte dar. Somit wiesen Sastre et al. {104} in 66%, Johnson et al. {55} in 45%, Khatib et al. {68} in 50% und Müller und Elstner et al. {64} in der Vorgängerstudie in 67,9% *Candida*-Isolate im Blut



nach. Anhand unserer Ergebnisse stellten, unter Zusammennahme von ZVK-Spitzen und Blutkulturen (n = 5), diese den Hauptisolationsort dar. An zweiter Stelle rangierte der Isolationsort „Urin“ (n = 4). Gefolgt von „Trachealsekret“ als dritthäufigstes kolonisiertes Material (n = 2). Bei Saxen et al. {24} repräsentierte das endotracheale Sekret sogar die häufigste Isolationsquelle, Baley et al. {3} wiesen in 24,1% *Candida*-Spezies im Trachealspirat nach. Bei Müller und Elstner et al. {64} verhielten sich zuvor genannte Isolationsstellen in umgekehrter Reihenfolge: Trachealsekret 53,3% und Urin als Isolationsort 46,7%.

Der Isolationsort Gastrointestinaltrakt wurde in unserem Fall durch einen Nachweis aus Magensaft (n = 1) repräsentiert. Baley et al. {3} nannten den Magen-Darmtrakt mit 71,8% an erster Stelle. El Mohandes et al. {93} präsentierten unterschiedliche Zahlen für eine Besiedelung des Intestinaltraktes je nach Ernährungssituation: früher enterale Ernährung 75% vs. parenterale Ernährung 33%. Des weiteren fand sich in einem Fall der systemischen Infektion eine Isolation von *Candida*-Spezies aus Hautabstrichen. In der Literatur wurde mehrfach im Zusammenhang mit der Unreife der Barrierefunktion der Haut von Frühgeborenen und der Entwicklung einer generalisierten systemischen *Candidiasis* berichtet {33,51,119,120}. Darmstadt et al. {119} wiesen bei acht von elf Patienten (73%) mit einem Geburtsgewicht unter 1000g eine systemische Infektion bei vorbestehender kutaner *Candidiasis* nach.

Aufgrund der geringen Fallzahl der systemischen Infektionen spiegeln unsere Ergebnisse keine repräsentativen Zahlen wider.

#### **4.2.2. Schweregrade der systemischen Infektionen**

Da bisher kein internationaler Standard zur Einteilung systemischer Pilzinfektionen bei Frühgeborenen festgelegt wurde, teilten wir unsere Fälle der systemischen Pilzinfektionen anhand der Isolationsorte nach Schweregraden ein, da ein nachgewiesener Zusammenhang zwischen Isolationsort und Schwere der Infektion besteht. So sind z.B. Urin oder Magensaft bereits generell mit einem erhöhten Kontaminationsrisiko verbunden, und eignen sich daher schlechter als Diagnosekriterium einer systemischen Infektion, als primär sterile Medien, wie z. B. Blut und Liquor (Definitionen der Schweregrade s. oben). Somit ist die hohe Isolation von Erregern aus Materialien wie Urin (30,8%) erklärbar. Anhand der Einteilung in Schweregrade konnten in unserer Arbeit vier „sichere“, eine „wahrscheinliche“ und drei „mögliche“ systemische Pilzinfektionen verzeichnet werden. Das Fehlen eines

einheitlichen Standards zur Diagnoseeinteilung bzw. –festlegung zieht ebenso eine Uneinheitlichkeit der Therapiestrategien und Aussagen zur Prognose mit sich. Hierzu konträr betrachten Saxen et al. {24} anhand ihrer Studienergebnisse keinerlei Relation zwischen Pilzisolationsort und Therapiestrategie bzw. –resultat. Ein Defizit dieser Studie liegt in der Untersuchung von neonatalen systemischen Pilzinfektionen, die ausschließlich durch *C. parapsilosis* verursacht wurden. Aufgrund des beschränkten Erregerspektrums ist die Aussagekraft dieser Studie in diesem Punkt nur begrenzt und es besteht weiterhin der dringliche Bedarf zur Erstellung internationaler Diagnose- und Therapiestandards.

#### **4.2.3. Kolonisationsstatus am Abstrichtag im Zusammenhang mit der Entwicklung einer systemischen Infektion**

Hinsichtlich des Gesamtpatientenkollektivs (n = 318) erkrankten 2,5% der Frühgeborenen (n = 8) oder bezogen auf den dokumentierten Kolonisationsstatus am Abstrichtag 5,5% aller besiedelten Patienten an einer invasiven *Candida*-Infektion (nur vier der Frühgeborenen waren bereits am Abstrichtag mit *Candida*-Spezies besiedelt). Es fiel auf, dass nur die Hälfte (n = 4) aller Patienten mit systemischer Infektion am bundesweiten Abstrichtag mit *Candida*-Spezies besiedelt und dem entsprechend vier unbesiedelt waren. In nur drei Fällen stimmte das Erregerprofil des Abstrichtags mit dem bei invasiver Pilzinfektion überein. Wie unter 4.2. erwähnt, wurde bereits in der Literatur öfters der Zusammenhang zwischen Kolonisation und Entwicklung einer späteren systemischen Infektion diskutiert. Unsere ermittelte allgemeine Kolonisationsrate lag bei 22,6%. Publizierten Daten von Baley et al. {3} zur Folge lag deren Kolonisationsrate bei 26,7%. El-Mohandes et al. {93} gaben eine Kolonisationsrate bei VLBW von 21% und bei ELBW von 24% an. Von zehn zunächst kolonisierten ELBW entwickelten 50% eine *Candidiasis*. In der vorliegenden Arbeit erkrankten insgesamt 2,5% aller Frühgeborenen später an einer systemischen Infektion. Bezogen auf die zuvor besiedelten Frühgeborenen waren es 5,5%. Vergleicht man die von uns ermittelte Kolonisationsrate bei den ELBW (n = 126) von 34,9%, gefolgt von einer *Candidiasis* in 9,1% (n = 4), mit den Ergebnissen anderer Arbeiten, so liegen unsere Daten für die Kolonisationszahlen etwas höher, weichen jedoch im Hinblick auf die Entwicklung einer systemischen Infektion entschieden ab. El-Mohandes et al. {93} untersuchten insgesamt 82 Patienten, worunter sich 61 VLBW und 25 ELBW fanden. Gründe für die Unterschiede in Kolonisationsraten und Auftreten

systemischer Infektionen können hierfür zum einen im geringeren nicht repräsentativen Patientenkollektiv El-Mohandes und zum anderen in einer anderen Auswahl der Isolationsorte liegen (El-Mohandes: Stuhlproben, Magenaspirat, Hautproben). Zudem schließen unsere Werte für ELBW auch Frühgeborene mit extrem niedrigem Geburtsgewicht (< 500g) ein.

#### 4.2.4. Erregerspektrum

In der Literatur sind unterschiedliche Werte zur Häufigkeit der einzelnen Spezies beschrieben. Generell werden *Candida*-Spezies als die häufigsten pilzlichen Vertreter der late-onset-Sepsis [14] mit 8% durch *C. albicans*, 55% durch koagulase-negative *Staphylokokken*, 15% durch *Staphylococcus aureus* und 5% durch *Escherichia coli* [94], bzw. der *Candidiasis* angesehen. Stoll et al. [89] fanden heraus, dass aus 9% der Blutkulturen Pilze isoliert werden und *Candida*-Isolate als prädominante Spezies bei systemischer Infektion fungieren. Folgende Angaben verschiedener Quellen stehen den unseren gegenüber:

Isolierte Spezies	C. alb.	C. para.	C. guill.	C. glab.	C. lusi.	C. krus.	c. trop.
<b>ESPED-Studie [64]</b>	69%	10,9%	0,7%	3,4%	0,7%	0,7%	3,4%
<b>Fernandez et al. [7]</b>	96 %	-	-	-	-	-	-
<b>Friedman et al. [9]</b>	78 %	20%	-	-	-	-	-
<b>Phillips et al. [33]</b>	25%	13%	-	-	-	-	3%
<b>Rangel-Frausto et al. [18]</b>	63%	29%	-	6%	-	-	-
<b>Saiman et al. [13]</b>	62,9%	28,6%	2,8%	5,7%	-	-	-
<b>Santos et al. [167]</b>	80%	-	-	-	-	-	-
<b>diese Studie</b>	<b>10%</b>	<b>40%</b>	<b>20%</b>	-	-	-	<b>10%</b>

Tabelle 20: Angaben verschiedener Autoren zur Häufigkeit der einzelnen *Candida*-Spezies bei *Candidämie*. *C. alb* = *C. albicans*, *C. para.* = *C. parapsilosis*, *C. guill.* = *C. guilliermondii*, *C. glab.* = *C. glabrata*, *C. lusi.* = *C. lusitaniae*, *C. krus.* = *C. krusei*, *C. trop.* = *C. tropicalis*.

In vorliegender Arbeit wurde als Haupterreger der systemischen Pilzinfektion *C. parapsilosis* (n = 4) isoliert. An zweiter Stelle rangierte die Spezies *C. guilliermondii* (n = 2). Darüberhinaus isolierten wir je einen Vertreter von *C. albicans* und *C. tropicalis*. In einem Fall (10%) konnte *Candida spp.* nicht näher differenziert werden. In

einem weiteren Fall (10%) wurden „Hefen allgemein“ als isolierte Spezies angegeben. Es muss beachtet werden, dass unsere Werte aufgrund der geringen Anzahl von Isolaten (n = 10) nicht repräsentativ sind. Allerdings darf man nicht unterschätzen, dass fehlende Ergebnisse von etwaigen Obduktionen verstorbener Risikofrühgeborener nicht berücksichtigt werden konnten, und somit auch weitaus höhere Resultate zu erwarten wären. Zunehmend wird in der Literatur die Zunahme von *non-albicans* Spezies als Verursacher der neonatalen systemischen Infektion diskutiert {11,18}. Daher fällt die Überrepräsentierung von *C. parapsilosis*, die auch schon Fernandez et al. {100} und Faix {44} in ihren Studien bemerkten, ebenso in unserer Studie auf. Fernandez et al. verzeichneten einen Anstieg von *C. parapsilosis* (96%) als Verursacher der *Candida*-Meningitis, obwohl dieser Erreger sonst eher selten mit dieser Form der systemischen *Candida*-Infektion assoziiert ist. Faix bemerkte eine generelle Zunahme der Spezies *C. parapsilosis* bei systemischen Pilzinfektionen {11,24,44}, teilweise schon in 15% der Fälle {7,24,37}. Auf manchen Neugeborenenintensivstationen ist *C. parapsilosis* schon das prädominante pilzliche Pathogen geworden {11,32}. *C. parapsilosis* wird auch eine starke Assoziation mit intravasalen Kathetern nachgesagt {3,38,61,115}. Auch in unseren Ergebnissen spiegelt sich eine solche Relation wider. Bei vier Patienten mit systemischer Infektion wurde unter anderem *C. parapsilosis* als Erreger isoliert. Es fiel auf, dass drei der Patienten einen Gefäßkatheter aufwiesen. Die überwiegende Zahl der Autoren sieht allerdings in *C. albicans* den häufigsten Erreger der *Candidiasis* {3,6,11,22,24,32,40,41}. Müller und Elstner et al. {64} beobachteten bei 74% der Patienten mit sicherer Infektion *C. albicans* als Verursacher. Allerdings fanden sich in 16% der sicheren systemischen Pilzinfektion *C. parapsilosis* als pilzlichen Erreger. Lee et al. {22} fanden in ihrer Studie bei 25 Fällen von *Candidiasis* oder *Candida*-Meningitis in 77% *C. albicans* als Verursacher des Krankheitsbildes. Karlowicz et al. {25} fanden in ihrer Arbeit für *C. albicans* eine Fallrate von 24%, für *C. parapsilosis* von 4%. Auch als Auslöser einer invasiven Pilzdermatitis wurde *C. albicans* als häufigster Erreger genannt {49}. Kaufman et al. {95} konnten bei zehn invasiven Pilzinfektionen *C. albicans* (n = 5), *C. parapsilosis* (n = 3), *C. glabrata* (n = 1) und *C. dublinensis* (n = 1) als Erreger isolieren. Neben *C. albicans* und *C. parapsilosis* wird auch *C. tropicalis*, wenn auch seltener, als Erreger genannt {3,35,64,99}. Finkelstein et al. {21} beschrieben ein „*C. tropicalis*-Outbreak“ auf einer Neugeborenenintensivstation durch Kreuzinfektion zwischen dem Personal und den Patienten. Rowen et al. {107} gaben die Häufigkeit von *C. tropicalis* mit 5,3% an. Auch andere *Candida*-Spezies können

eine invasive Pilzinfektion verursachen, obwohl diese einen eher geringen Anteil darstellen. Zu diesen *Candida*-Spezies zählen unter anderem *C. glabrata* (1,6%), *C. guilliermondii* (1,6%) und *C. lusitaniae* (1,6%) {107}. Jedoch schwanken Angaben zur Häufigkeit der Spezies je nach Studiendesign und Patientenzahl.

#### **4.2.5. Individuelle Patientendaten bei systemischer Infektion**

Die Fälle der systemischen Infektion wurden nach den bereits zuvor erwähnten Risikofaktoren zum Zeitpunkt des Abstrichtags ausgewertet. Es fiel auf, dass bei jedem Patienten mindestens zwei Risikofaktoren ermittelt wurden. Das kleinste Frühgeborene, mit einem ursprünglichen Geburtsgewicht von 490g und einem Gestationsalter von 23 SSW wies sogar fünf prädisponierende Faktoren gleichzeitig auf. Natürlich bringen das niedrige Geburtsgewicht und Gestationsalter eine Reihe von Interventionen mit sich, womit das Vorhandensein dieser Vielzahl von Maßnahmen erklärt wird, z.B. Kortikosteroide, die wie bei Patient 1, zur Prophylaxe der bronchopulmonalen Dysplasie eingesetzt werden. Bei fünf Kindern lag eine gleichzeitige antibiotische und antimykotische Behandlung vor. Auch in der Arbeit von El-Mohandes et al. {93} ging allen Fällen der Frühgeborenen mit *Candidiasis* eine vorherige antibiotische Therapie über 14 bis 21 Tagen voraus. Ebenso fanden sich als weitere Risikofaktoren in deren Studie das Vorliegen von zentralen Venenkathetern und ein später Beginn der enteralen Ernährung. Diese Ergebnisse sind durchaus mit unseren vereinbar. In vorliegender Arbeit wurde viermal als Indikation für eine antimykotische Intervention die gleichzeitig bestehende Antibiose genannt. Trotz antimykotischer Therapie (Applikation viermal topisch und einmal systemisch) wurde bei zwei Patienten bereits eine Kolonisation mit *Candida*-Spezies am Abstrichtag nachgewiesen. Dies zeigt, dass auch trotz Einsatz antimykotischer Substanzen, eine Besiedlung und eine darauffolgende systemische Infektion nicht vollständig zu verhindern ist. Zwar ist die Kolonisationsrate zu senken, eine Veränderung des Keimspektrums aber eher nicht zu erwarten. Kicklighter et al. {27} bestätigen dies in ihrer Arbeit. Sie verglichen eine Gruppe, die eine Fluconazol-Prophylaxe erhielt, mit der Placebo-Gruppe hinsichtlich der Kolonisationsrate und Veränderungen des Keimspektrums. Das Keimspektrum der Prophylaxe-Gruppe vs. Placebo-Gruppe ergab folgendes: *C. albicans*: 13% vs. 24%, *C. parapsilosis*: 2% vs. 20% und *C. glabrata*: 2% vs. 2%. Spezies wie *C. lusitaniae* (6%) und *C. tropicalis* (2%) konnten nur noch in der

Placebo-Gruppe isoliert werden. Trotz der zahlreichen Risikofaktoren waren nur vier der acht Patienten mit systemischer *Candida*-Infektion am Abstrichtag besiedelt.

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und Gestationsalter mit einer Besiedlung, konnte man auch hier bemerken, dass dies keine generelle Annahme ist. Zwar wurde bei einem „extremely-low-birth-weight“ Frühgeborenen (Geburtsgewicht: 490g) eine Besiedelung festgestellt, bei drei weiteren Frühgeborenen, die zu den „very-low-birth-weight-infants“ zählten, keine Kolonisation am Abstrichtag nachgewiesen werden. Allerdings muss erneut erwähnt werden, dass es sich hier um eine sehr geringe Fallzahl, und somit nicht um allgemein repräsentative Werte handelt.

Mehrere Autoren sehen auch, wie bereits diskutiert einen Zusammenhang des Geburtsmodus mit der einfachen Kolonisation {3,15}. Hinsichtlich der Fälle mit systemischer *Candidiasis* (n = 8) ergab sich ein ausgewogenes Bild: Von allen vaginal entbundenen Frühgeborenen (n = 4) waren zwei am Abstrichtag besiedelt und zwei nicht. Die Hälfte aller Patienten (n = 4), die per Kaiserschnitt auf die Welt kamen, waren am Abstrichtag kolonisiert. Somit kann auch hier der Einfluss des Geburtsmodus auf die Kolonisation nicht bestätigt werden.

Hinsichtlich der Dauer bis zum Ausbruch einer systemischen Infektion schwanken unsere Werte stark. War einerseits der früheste Ausbruch nach elf Tagen zu verzeichnen, trat andererseits der späteste nach 38 Tagen auf. Die Dauer wurde ab der Geburt berechnet, unabhängig davon, ob das Frühgeborene zu diesem Zeitpunkt besiedelt war. Der Mittelwert lag bei 21,5 Tagen. Unsere Ergebnisse sind teilweise ähnlich denen von Melville et al. {51}. Sie fanden heraus, dass der Ausbruch einer *Candidiasis* bei Frühgeborenen meist nach ungefähr einem Monat auftritt {51,121}. Baley et al. {43} schätzten die Dauer eines Ausbruchs auf ungefähr 33 Tage nach der Geburt. Sherertz et al. {38} legten sich auf einen Auftritt der *Candida*-Infektion nach 35 Tagen (im Mittel) seit Beginn der Hospitalisation fest. Etwas niedriger lagen Friedman et al. {53}. Sie beschrieben ein mittleres Alter von 15 Tagen beim Ausbruch der systemischen Infektion. El-Mohandes et al. {93} ermittelten einen Zeitraum zwischen 14 und 31 Lebenstagen für den Ausbruch einer *Candidiasis*.

Mehrere Autoren beschrieben, dass bis zu 70% der Frühgeborenen mit einer systemischen *Candida*-Infektion im Verlauf dieser Erkrankung versterben {3,44,55}. Baley et al. {43} nennen in ihrer Arbeit aus dem Jahre 1984 eine Mortalitätsrate von 60-70%. Unsere Daten zeigen, dass zum Zeitpunkt des Follow-up noch sechs Patienten in stationärer Behandlung waren und ein Frühgeborenes bereits entlassen war. Nur ein

Patient mit *Candidiasis* (12,5%) überlebte das Follow-up-Intervall nicht. Jedoch ist es möglich, dass nach dem Untersuchungszeitpunkt weitere der hospitalisierten Patienten verstorben sind. Bei anderen Autoren liegt die Mortalitätsrate mit 25-60% bei Frühgeborenen etwas niedriger {41,56,88}. Kossoff et al. {11} trennten die Mortalitätsraten nach Spezies auf. So schrieben sie *C. albicans* mit 26% eine höhere Mortalität zu, als *C. parapsilosis* mit 4%

#### **4.2.6. Antimykotische Therapie systemischer Pilzinfektionen**

In der Therapie systemischer Pilzinfektionen bei Frühgeborenen konnte bisher kein allgemeingültiger Standard festgelegt werden. Zwar gilt die Monotherapie mit Amphotericin B, eventuell auch als Kombinationstherapie mit 5-Fluorocytosin, als Mittel der Wahl {32,35,40,55,122}, dennoch wird sie aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen nicht gezielt und konsequent in ausreichender Dosierung {64} eingesetzt. Ein Problem stellt hierbei die unzureichende klinische Erprobung der zur Verfügung stehenden Antimykotika bei Frühgeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht dar. Dies liegt einerseits an geringen Patientenzahlen und andererseits an der Schwierigkeit von Studien zur Pharmakokinetik und -dynamik bei Frühgeborenen unterschiedlichen Gestationsalters. In dieser Studie erhielten drei Patienten konventionelles Amphotericin B und zwei weitere Frühgeborene liposomales Amphotericin B. Die Kombination mit 5-Fluorocytosin kam nur zweimal zum Einsatz. Trotz der Gefahr der Resistenzentwicklung einer Fluconazol-Therapie {32}, kam Fluconazol dreimal als Monotherapie und dreimal als Kombinationstherapie (zweimal in Kombination mit Amphotericin B und 5-Fluorocytosin, einmal in alleiniger Kombination mit Amphotericin B) zum Einsatz. Eine generelle Fluconazol-Resistenz von *C. glabrata* bzw. *C. krusei* wird postuliert {13,81}. 5-Fluorocytosin wurde aufgrund einer raschen Resistenzentwicklung nie als Monotherapie eingesetzt. Diese Daten spiegeln allerdings Therapiestrategien eines kleinen Patientenkollektivs wider und können daher nicht repräsentativ auf die gesamte Frühgeborenenpopulation übertragen werden. Aufgrund der uneinheitlichen Therapiestrategien sollten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Verträglichkeit, der Resistenzentwicklung und der Entwicklung eines Therapiestandards für Antimykotika bei Frühgeborenen angestrebt werden.

### **4.3. In vitro Empfindlichkeitsverhalten verschiedener Candida-Spezies gegenüber Antimykotika**

Neben der molekularbiologischen Typisierung wurde auch die Empfindlichkeit der einzelnen Spezies auf verschiedene Antimykotika untersucht. Zu jedem Isolat wurde ein Profil der antimykotischen Empfindlichkeit erstellt. Anhand der Ergebnisse der antimykotischen Empfindlichkeitstestung konnte der überwiegende Teil der Isolate als gut empfindlich gegenüber den getesteten Antimykotika eingestuft werden. Allerdings verzeichneten wir auch einige Resistenzen. Besonderes Augenmerk fiel auf die Resistenzdaten von sechs Stämmen, welche mit den Ergebnissen der Typisierung verglichen wurden, um etwaige Übereinstimmungen oder Abweichungen der MHK-Werte bei genetisch verwandten Isolaten zu identifizieren. Alle anderen Isolate stellten sich anhand der NCCLS-Breakpoints {123} als empfindlich gegenüber allen getesteten Antimykotika dar. Therapeutische Interventionen und Zusammenhänge wurden bereits ausführlich besprochen und werden hier nicht mehr gesondert erwähnt.

In zahlreichen Publikationen werden Angaben zur antimykotischen Empfindlichkeit gemacht, im Falle von MHK-Werten bei Isolaten von Früh- oder Neugeborenen liegen in den meisten Fällen, aufgrund des geringen Patientenkollektivs, oft nur Einzelwerte oder wenige Daten vor. Meistens basieren die Werte der MHK auf den Richtlinien des Dokuments M27-A der NCCLS {123} und den dort festgelegten Breakpoints (siehe Material und Methoden). Pfaller et al. {28} untersuchten im Zeitraum zwischen 1997 bis 2000 insgesamt 2.047 Fälle von „Bloodstream-Infektionen“, die durch *Candida*-Spezies verursacht wurden, aus den Ländern USA, Kanada, Lateinamerika und Europa. In den verschiedenen Alterskategorien ( $\leq 1$  Jahr, 2-15 Jahre, 16-64 Jahre und  $\geq 65$  Jahre) wurden die häufigsten Erreger und deren Empfindlichkeit gegenüber Antimykotika ermittelt. Sie erkannten einen Trend, der aufzeigte, dass mit steigendem Patientenalter die Empfindlichkeit der *Candida*-Spezies gegenüber Fluconazol, Itraconazol, Amphotericin B und 5-Fluorocytosin sinkt. Insbesondere fanden sie bei den unter einjährigen Patienten keine resistenten *C. glabrata*. Ruiz-Diez et al. {65} bestimmten in ihrer Studie die MHK für 36 Isolate von neun Frühgeborenen. Die Isolate der Patienten zwei bis neun waren alle sensibel gegenüber Fluconazol, Ampho B, 5-FC und Itraconazol. Hingegen bei den Isolaten (1-10) von Patient eins konnte eine Resistenz gegenüber Fluconazol (MHK  $> 128 \mu\text{g/ml}$ ) und Itraconazol (MHK  $> 8 \mu\text{g/ml}$ ) festgestellt werden. Sie waren aber empfindlich für Ampho B (MHK  $1,0 \mu\text{g/ml}$ ) und 5-FC (MHK  $0,12 \mu\text{g/ml}$ ). Zwar sind Resistenzen von *C. albicans*-Stämmen in der Literatur



beschrieben, jedoch sind erhöhte MHK-Werte eher bei non-*albicans*-Spezies verbreitet und bekannt {124}. Auch bei anderen Autoren wurden Isolate mit Fluconazol-Resistenz beobachtet. So berichten Welbel et al. {37} von einem Fluconazol-resistenten *C. parapsilosis*. Rowen et al. {107} konstatierten einen nicht unerheblichen Teil von Isolaten unterschiedlicher Spezies, genauer gesagt alles non-*albicans*-Spezies, mit einer Resistenz gegenüber Fluconazol. Saiman et al. {14} fanden drei Stämme von *C. albicans* (MHK  $\geq$  64  $\mu$ g/ml) mit einer Fluconazol-Resistenz und zwei *C. glabrata*-Isolate (MHK 16  $\mu$ g/ml) mit einer dosis-abhängigen Empfindlichkeit. Kicklighter et al. {27} untersuchten den Effekt einer Fluconazol-Prophylaxe auf die Entwicklung einer *Candida*-Resistenz und stellten im Gegensatz fest, dass es keine Unterschiede in den MHK-Werten der behandelten Patienten und denen der Kontroll-Gruppe, während der Behandlungsperiode oder innerhalb der vierwöchigen Periode nach Beendigung der Fluconazol-Therapie, gab. Konträr hierzu stellt sich die Situation eines Patienten in der Studie von van Belkum et al. {69} dar. Ein Isolat eines Patienten wurde nach der Fluconazol-Behandlung als resistent getestet. Kovacicova et al. {125} berichten von resistenten *C. guilliermondii*- und *C. parapsilosis*-Isolaten gegenüber Ampho B in einem Kollektiv von Krebs- und Nicht-Krebspatienten. Sogar neun von elf *C. krusei*-Stämmen wiesen eine Resistenzlage gegenüber Fluconazol auf, wobei die verbleibenden beiden nur eine dosis-abhängige Empfindlichkeit zeigten. Ebenso erwiesen sich je ein Isolat der Spezies *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* und weiterhin zwei *C. glabrata*-Isolate als Fluconazol-resistent. Generell fiel auf, dass Resistenzen gegenüber Ampho B und 5-FC eher seltener auftraten. Über eine Resistenz von *C. krusei* und *C. glabrata* gegen Azole berichteten auch Reiss et al. {13}. Dementsprechend wurde auch bei uns ein *C. glabrata*-Isolat (FG506/2) mit Itraconazol-Resistenz (MHK 1,0  $\mu$ g/ml) gefunden. Da dieses eine Einzelisolat aus Duisburg darstellte und generell nur zwei *C. glabrata* in der Studie isoliert wurden, konnten keine Schlüsse aus einer vergleichenden Untersuchung auf molekularbiologischer Ebene gezogen werden. McCullough et al. {126} hingegen fanden konträr zu Kovacicova et al. {125} erhöhte Resistenzwerte bei 5-FC für *C. albicans*. Damit verglichen konnte bei uns in drei Fällen (*C. albicans*) eine 5-FC-Resistenz (bei allen drei Isolaten: MHK > 64  $\mu$ g/ml) ermittelt werden. Hierbei war besonders interessant, dass alle drei Isolate aus derselben Klinik stammten (Leipzig). „FG263/1“ und „FG264“ stellten hierbei zwei Isolate desselben Patienten dar. „FG265“ war ein Stamm eines anderen nicht verwandten Frühgeborenen dieser Klinik. Beide wiesen mindestens zwei Risikofaktoren (parenterale Ernährung, Antibiose, Katecholamine, Kortikosteroide) auf.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Typisierung zeigte, dass auch hier bei allen drei Isolaten eine „höchstwahrscheinliche“ Verwandtschaft bestand. Hieraus können Rückschlüsse auf den Erwerb der Erreger gezogen werden. Da beide Patienten in keinem verwandtschaftlichen Verhältnis standen, ist der nosokomiale Erwerb durch horizontale Transmission der wahrscheinlichste Übertragungsweg. Nähere Untersuchungen hinsichtlich der lokalen Gegebenheiten oder hygienischen Maßnahmen dieser Klinik wurden nicht erörtert. In unserer Studie trat eine Fluconazol-Resistenz (MHK > 64 µg/ml) nur bei einem Isolat der Spezies *C. krusei* (FG343) auf. Wobei Resistenzen von *C. krusei* gegenüber Fluconazol bereits in der Literatur als intrinsisch bekannt sind [81]. Darüber hinaus bestand bei diesem Stamm eine Kreuzresistenz mit Ampho B (MHK 2 µg/ml). Da dieses ein Einzelisolat eines Patienten aus Datteln darstellte, konnten zum einen die Resistenzdaten nicht mit weiteren MHK-Werten von Isolaten dieser Klinik verglichen werden und zum anderen keine vergleichenden Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene angestrengt werden. Aufgrund des Studiendesigns stand kein weiteres Isolat dieses Patienten, z.B. vor oder nach erfolgter Therapie, zur Verfügung, woraus Rückschlüsse auf die Entstehung der Resistenz hätten gezogen werden können. Huang et al. [127] erforschten die Verteilung der MHK-Werte für *Candida*-Isolate von „Bloodstream-Infektionen“ bei Neugeborenen, ebenso wie die etwaige Korrelation zwischen klinischem „Outcome“ und antimykotischer Empfindlichkeit. Bei je drei Stämmen lag eine Resistenz gegenüber Ampho B und Fluconazol vor. Keines der Isolate wies eine 5-FC-Resistenz auf. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass die angenommene Korrelation zwischen „Outcome“ und antimykotischer Empfindlichkeit nicht bestätigt werden konnte, dass die Empfindlichkeit aber den klinischen Ausbruch bzw. Verlauf beeinflussen könne. Allerdings muss ein niedriger MHK-Wert nicht unbedingt mit einer erfolgreichen Therapie einhergehen. King et al. [128] und Merz [129] berichteten von Amphotericin B-Resistenzen bei *C. lusitaniae*. Unsere Auswertungen ergaben ebenfalls eine Resistenz eines von fünf *C. lusitaniae*-Isolaten (FG64) mit einer MHK von 2 µg/ml. Auch in diesem Fall lag nur dieses Einzelisolat eines Frühgeborenen aus Siegen vor, weshalb keine weiteren vergleichenden Untersuchungen möglich waren. Barchiesi et al. [130] untersuchten die antimykotische Empfindlichkeit von 46 *C. parapsilosis*-Isolaten gegenüber verschiedener Antimykotika, jedoch stammten die Isolate nicht von Frühgeborenen. 100% der Stämme waren gegen Fluconazol und 5-FC, 98% gegen Ampho B empfindlich. Im Falle von Itraconazol waren 98% nur dosis-abhängig

empfindlich. Es traten aber keinerlei Resistenzen auf. Auch in unserer Studie konnte bei keinem Stamm der Spezies *C. parapsilosis* eine Resistenz nachgewiesen werden.

#### **4.4. Beurteilung der molekularbiologischen Verwandtschaft unterschiedlicher Candida-Spezies**

Unser Ziel war es anhand molekularbiologischer Untersuchungen eine horizontale Ausbreitung genetisch identischer Stämme sowie die Besiedelung unterschiedlicher Körperregionen mit genetisch identischen Stämmen nachzuweisen. Abrundend wurde das antimykotische Resistenzverhalten bei genetisch identischen bzw. verwandten Stämmen bewertet. Hieraus ergibt sich die Relevanz zur genauen molekularbiologischen Speziesidentifizierung und zu weiteren Therapieempfehlungen.

##### **4.4.1. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden**

###### **RAPD-PCR zur Differenzierung von Candida-Spezies**

Je nach Primer (Primer RPO2 und RSD12) und getesteter Spezies gelang mit der RAPD eine Zuordnung zu einem Verwandtschaftsgrad, der durch ein anderes molekularbiologisches Verfahren bestätigt oder nicht bestätigt wurde. Innerhalb der Spezies *C. albicans* vermochte die RAPD mit Primer RPO2 eine hohe Anzahl an stabilen Banden zu generieren und besaß somit eine hohe Potenz mögliche genetische Unterschiede zu bemerken. Aufgrund der Ergebnisse der zweiten oder dritten Methode (ein weiterer Primer, eine andere PCR oder Southern-Blotting) konnten die Ergebnisse miteinander in Relation gesetzt werden, und somit deren Aussagekraft beurteilt werden. Die Isolate der Spezies *C. parapsilosis* wurden zusätzlich mit dem spezifischeren Primer RSD12 untersucht. Hierbei erwies sich der Primer RPO2 als weniger sensitiv, um genetische Unterschiede bzw. verwandtschaftliche Verhältnisse innerhalb dieser Spezies zu detektieren. Die Isolate der Spezies *C. lusitaniae* wurden mit Primer RPO2 und der wenig sensitiven IR-PCR untersucht. In nur drei Fällen ergab sich dasselbe Resultat mit der IR-PCR als zweitem Verfahren. Auch bei der Zuordnung der fünf Isolate der Spezies *C. guilliermondii* stimmten nur in zwei Fällen die Ergebnisse von RAPD und IR hinsichtlich des Verwandtschaftsgrades überein. Bei den übrigen Isolaten (zwei Isolate Spezies *C. glabrata*, ein Isolat *C. krusei*) ist eine

Aussage über die verwandtschaftlichen Verhältnisse aufgrund der geringen Isolatanzahl nicht repräsentativ. Schon 1993 beschrieben Sullivan et al. {82} die Parameter für die RAPD-PCR, wie sie in unserer Studie Verwendung fand. Allerdings benutzten sie in ihrer Arbeit verschiedene andere Primer, mit denen sie zwischen *C. tropicalis*, *C. glabrata* und atypischen *Candida*-Isolaten differenzieren konnten. Eine Unterscheidung zwischen *C. krusei* und *C. parapsilosis* misslang. An Stelle dieser Primer kamen in unserer Arbeit der Einzelprimer RPO2 {84} und bei *C. parapsilosis* zusätzlich der Einzelprimer RSD12 {85} zum Einsatz. Dassanayake und Samaranyake {85} untersuchten mit vier verschiedenen Primern *C. parapsilosis*-Stämme mit dem RAPD-Verfahren auf ihre genotypische Heterogenität. Am nützlichsten erwies sich hierbei der Primer RSD12. Dies konnten wir anhand unserer Ergebnisse bestätigen. Konnten im visuellen Vergleich mit RPO2 keine genetischen Unterschiede gefunden werden, vermochte es der Primer RSD12 aufgrund seiner Spezifität diese genauer zu detektieren. Zwar gibt es in der Literatur zahlreiche Publikationen zum Einsatz der RAPD, jedoch fehlen bislang Untersuchungen in der Größenordnung dieser Studie zur Beurteilung des Verfahrens. So setzten Sullivan et al. {30} 1995 den Primer RPO2 mit der RAPD zur Typisierung der genomischen DNA von atypischen oralen *Candida*-Stämmen von HIV-positiven und -negativen Patienten ein, und bestätigten mit diesem Verfahren seine zuvor mit einer *C. albicans*-spezifischen-Sonde (27A) und verschiedenen Oligonukleotiden gewonnenen Ergebnisse. Auch Lehmann et al. {131} verwendeten die RAPD-PCR zur Untersuchung der genetischen Verwandtschaft von klinisch relevanten Stämmen der Spezies *Candida*. Sie beobachteten „distinktive“ und reproduzierbare Sets von PCR-Produkten und wiesen anhand dieser mit der RAPD inter- und intraspezifische Polymorphismen nach. Mit diesem Verfahren konnten physiologisch homogen wirkende *C. parapsilosis*-Stämme in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Weiterhin unterschieden sich in den PCR-Profilen nicht-verwandte Stämme von den Referenzstämmen, was für eine hohe Diskriminierungspotenz sprach. Lehmann et al. bewerteten dieses Verfahren als einfach und zuverlässig, weshalb es zur Feststellung von Genotypen bei der Taxonomie-Beschreibung, Identitätsbestätigung von Stock-Isolaten, Typing von *Candida*-Spezies in größeren epidemiologischen Studien und zur rapiden Identifikation von pathogenen Pilzen geeignet erschien. Auch Vrioni et al. {132} benutzten die RAPD zur Unterscheidung von 40 Isolaten verschiedener *Candida*-Spezies, um deren Verwandtschaft und Herkunft zu untersuchen. Mit der RAPD konnten sie alle Stämme in die Gruppen *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* einordnen und konnten

aufgrund der teilweise verwandten Genotypen eine Aussage über den Erwerb der Keime treffen. Lin et al. {133} bestätigten anhand der unterschiedlichen RAPD-Profile die Heterogenität ihrer Isolate, die schon anhand von Isoenzym-Unterschieden ermittelt wurden. Die großen Vorteile der RAPD sahen Sullivan et al. {134} in der Einfachheit, der Schnelligkeit und in der großen einzusetzenden Probenanzahl. Diesen Aspekt können wir bestätigen, da in dieser Studie eine grosse Anzahl von Isolaten zu untersuchen war. Zu den vorher genannten Vorteilen betonten Gil-Lamaignere et al. {31} in ihrer kritischen Arbeit über die Möglichkeiten und Grenzen molekularer Typisierungsverfahren, dass die RAPD ein relativ günstiges und technisch einfaches Verfahren sei, mit welchem ein breites Spektrum an verschiedenen Pilzspezies untersucht werden kann. Darüber hinaus konnten anhand dieses Verfahrens oftmals genetische Variationen unter den verschiedenen Isolaten erkannt werden, welche sich in den Ergebnissen von RFLP-Analysen oder Southern-Blotting nicht darstellten. Allerdings muss die RAPD auch kritisch betrachtet werden. Viele methodische Aspekte, wie kleine Unterschiede in der Konzentration des Primers oder der zu vervielfältigenden DNA, Veränderungen der Amplifikationstemperatur, Änderungen der Magnesiumkonzentration des Reaktionsmixes oder die Qualität des *Taq*-Enzyms, können die Reproduzierbarkeit beeinflussen, auch wenn interne Standards gewahrt werden {31}. Schließlich kann es durch die Subjektivität des visuellen Bandenvergleichs zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen {31,135,136}, weshalb wir mindestens ein zweites Verfahren zur Bestätigung der Ergebnisse empfehlen würden.

### IR-PCR zur Differenzierung von *Candida*-Spezies

Die IR-PCR mit der Primer-Kombination 1245/1246, bereits von van Belkum et al. {69} beschrieben, wurde bei allen *Candida*-Spezies außer *C. albicans* als zweites bzw. drittes (*C. parapsilosis*) Verfahren eingesetzt. Innerhalb der Spezies *C. parapsilosis* ergab dieses Verfahren vergleichbare Ergebnisse wie mit der unspezifischeren RAPD mit Primer RPO2. Die speziesspezifischere RAPD mit RSD12 unterschied jedoch genauer zwischen den Stämmen. Zweimal konnte das Ergebnis aufgrund schlechter Bandendarstellung nicht ausgewertet werden. Innerhalb der Spezies *C. lusitaniae* wurde den Isolaten mit der IR-PCR eine höhergradige Verwandtschaft zugewiesen, die jedoch mittels RAPD, die genauer zu differenzieren vermochte, nicht bestätigt wurde. Auch hier konnte bei einem Stamm die IR nicht ausgewertet werden. Ebenso unterlegen war die IR-PCR im Falle der *C. guilliermondii*-Isolate, die alle als

„höchstwahrscheinlich verwandt“ beurteilt wurden. Auch hier dominierte die RAPD und differenzierte die Verwandtschaftsbeziehung genauer. Die Auswertung der restlichen Isolate ist wegen der geringen Probenanzahl nicht repräsentativ.

Bereits 1994 untersuchten van Belkum et al. {69} in ihrer Arbeit mit der IR-PCR 40 Stämme von 24 Patienten auf ihre genotypischen Eigenschaften. Mit unterschiedlichen Primer-Kombinationen, unter denen sich auch die von uns eingesetzte Kombination von Primer 1245/1246 befand, konnten sie feststellen, dass Stämme der selben Patienten, die aber zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert wurden, zunächst in ihrem Genotyp konstant blieben. In 29% (sieben von 24 Patienten) der Fälle konnten aber mit der IR-PCR Abweichungen vom häufigsten angetroffenen DNA-Profil gefunden werden. Unter allen Kombinationen erwies sich die von uns gewählte als potenteste hinsichtlich ihrer diskriminatorischen Fähigkeiten. Die Autoren sahen auch die Reproduzierbarkeit des Verfahrens und die Möglichkeit DNA mit geringerer Qualität einzusetzen als Vorteil dieser Methode. Unsere Ergebnisse belegen diesen Vorteil nur zum Teil. Zwar konnte eine geringere DNA-Qualität verwendet werden, allerdings konnten nicht immer stabile und gut verwertbare Banden reproduziert werden. Allerdings stammen die Sequenzen der Primerkombinationen aus einer Arbeit von Versalovic et al. {86}. Sie wählten diese Sequenzen ursprünglich zur Festlegung der Verteilung von zwei unterschiedlichen prokaryotischen repetitiven Elementen. Da diese repetitiven DNA-Elemente in einer Vielzahl von Genomen unterschiedlicher Mikroorganismen enthalten sind, so auch in *Candida*-Genomen, konnten diese Sequenzen zur schnellen Identifizierung bei Bakterien-Spezies und prokaryontischen Genomen eingesetzt werden.

### Southern-Hybridisierung zur Differenzierung von *Candida*-Spezies

Die Hybridisierung mit der CARE-2-Sonde, die bereits in der Arbeit von Lasker et al. {87} als ein Blotverfahren ausschließlich für *C. albicans* beschrieben wurde, kam in dieser Studie als Bestätigungsverfahren dieser Spezies zum Einsatz. Die hohe Diskriminierungspotenz wird durch unsere Ergebnisse eindeutig belegt. Wurde drei Isolaten anhand der RAPD ein geringerer Verwandtschaftsgrad zugeteilt, erwiesen sie sich mit dem Southern-Blot tatsächlich als „höchstwahrscheinlich verwandt“. Darüberhinaus war die Southern-Hybridisierung aufgrund der Vielzahl generierter Banden in der Lage einzelne Isolate noch weiter auf ihre verwandtschaftlichen Beziehungen zu untersuchen. Auch Müller et al. {76} sahen in der CARE-2-

Hybridisierung ein standardisiertes und reproduzierbares Verfahren und setzten dieses in einer großen epidemiologischen Studie zur Beschreibung von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen *C. albicans*-Isolaten ein. Unter der Vielzahl der Methoden zum Fingerprinting von infektiösen Pilzen sehen Lockhart et al. {137} Southern-Blotting mit verschiedenen speziesspezifischen Sonden, als die vielseitigste Methode. In ihrer Arbeit konnten mittels der Hybridisierung Aussagen über Verwandtschaftsverhältnisse getroffen werden. So waren z.B. Stämme höchstwahrscheinlich, gering, überhaupt nicht verwandt oder gar identisch. Sie untersuchten sowohl die CARE-2, als auch die Ca3. Der CARE-2 schrieben sie die Fähigkeit zu, bei Outbreak-Untersuchungen oder geringen Fallzahlen festzulegen, ob die Isolate identisch oder höchstgradig verwandt sind. Jedoch bescheinigten sie ihr eher eine geringe Fähigkeit, bei großen epidemiologischen Studien, geringgradig verwandte Isolate durch Cluster-Analyse in Gruppen einzuteilen. Sie bewerteten die Ca3 der CARE-2 als überlegen und vielseitiger, um mikroevolutionäre Veränderungen zu entdecken, und gering verwandte Stämme zu clustern. Aufgrund unserer Ergebnisse und Erfahrungen mit dieser Methode sind auch hier kritische Äußerungen zu tätigen. Zum einen stellt das Southern-Blotting mit der CARE-2-Sonde ein ausschließlich für *C. albicans* spezifisches Verfahren dar und zum anderen, bedingt durch viele Einzel- und Inkubationsschritte, eine sehr zeitaufwendige Methode. Weiterhin erwies sich das Southern-Blotting auch als sehr störanfällig. Kleinste Änderungen in den Konzentrationen der verwendeten Lösungen oder verwendeten Materialien konnten große Einflüsse auf die Verwertbarkeit der Ergebnisse haben.

#### Direkter Vergleich von Methoden zur Typisierung von Candida-Spezies

In einer Vielzahl von Studien zur genomischen und epidemiologischen Untersuchungen von *Candida*-Spezies wurden verschiedene PCR-Methoden untereinander oder mit Hybridisierungsverfahren kombiniert, um direkt und anhand derselben Isolate deren Fähigkeit zu testen, zwischen und innerhalb einer *Candida*-Spezies zu differenzieren. In einer Arbeit von di Francesco et al. {138} wurden 35 *C. glabrata*-Isolate von 29 Patienten mit vier Typing-Methoden untersucht. Die anschließende Auswertung, hinsichtlich der mit jedem einzelnen Verfahren erzielten Anzahl an DNA-Typen, ergab die höchste diskriminatorische Potenz für das EK (Elektrokaryotyping). An zweiter Stelle folgte die RAPD, anschließend die IR und zuletzt die RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus). Als Fazit dieser

Studie bemerkten die Autoren, dass PCR-basierte Methoden zur epidemiologischen Erforschung von *C. glabrata*-Infektionen eingesetzt werden könnten. Eine Kombination von RAPD und IR legte zwar einen Genotyp weniger fest, als EK und RAPD, war diesen aber in den Faktoren Schnelligkeit, Laboraufwand und Ökonomie deutlich überlegen. Auch Lockhart et al. {137} verwendeten die RAPD in Kombination mit Southern-Blotting zur Typisierung von *C. glabrata*. King et al. {128} verwendeten drei Pulsfeld-Elektrophorese-Methoden und die RAPD zum Fingerprinting von *C. lusitaniae* und folgerten aus den Ergebnissen, dass die RAPD den Pulsfeld-Methoden diskriminatorisch überlegen war, und zwischen epidemiologisch verwandten und nicht verwandten Stämmen zu unterscheiden vermochte. Der Einsatz sei auch zum Aufspüren geringer Veränderung innerhalb einer Population möglich. Das Ziel einer Studie von Pujol et al. {139} war es, Fragen zur Diskriminierungsfähigkeit, der mit den verschiedenen Verfahren erzeugten Bandenmuster, und zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu beantworten. 29 *Candida*-Isolate wurden mit der RAPD (acht verschiedene Primer), MLEE (Multilocus-Enzym-Elektrophorese) und Southern-Blotting mit den Sonden CARE-2 und Ca3 typisiert. Alle Methoden wurden auf ihre Fähigkeit hin, offensichtlich epidemiologisch unverwandte und höchstwahrscheinlich verwandte Isolate zu unterscheiden, untersucht. Die Fähigkeit aller drei Methoden, die Isolate in Cluster (Verwandtschaftsgruppen) zu gruppieren, lag in ähnlichen Bereichen. Mit der CARE-2-Sonde konnte anhand des Southern-Blot-Verfahren die höchste Anzahl polymorpher Banden generiert werden, was auch unsere Ergebnisse zeigten. Die RAPD wurde auch bei diesen Autoren als die schnellste Methode angesehen, schnitt aber bei der Reproduzierbarkeit von Banden am schlechtesten ab. Unsere Erfahrungen mit der RAPD stellen diese Methode in Bezug auf die Schnelligkeit ebenso an die erste Stelle, im Punkt der Reproduzierbarkeit können keine negativen Aussagen getätigt werden. Die Ergebnisse des Southern-Blot-Verfahren mit der CARE-2-Sonde galten als reproduzierbar, das Verfahren generell als relativ schnell und als guter Indikator für Mikroevolutionen. Lockhart et al. {70} untersuchten Stammänderungen bei rezidivierender *Candida*-Vaginitis anhand Hybridisierung mitunter auch anhand der unverwandten Sonde CARE-2. Die Ergebnisse sprachen auch in dieser Studie der Sonde CARE-2 die Fähigkeit zu, Verwandtschaftsgruppen zu bilden. Bart-Delabesse et al. {140} setzten zur Untersuchung eines Clusters von *Candida*-Septicämie bei vier Verbrennungspatienten die RFLP und eine Analyse der MHK ein. Anhand der genotypischen Ergebnisse konnten teilweise Übereinstimmungen zwischen Patienten-Stämmen und Isolaten, die von der Kleidung



des Pflegepersonals entnommen worden waren, gefunden werden. Auch hier waren sich die Autoren einig, dass nur eine Kombination reproduzierbarer Methoden sichere und genaue Ergebnisse erzielen würde.

Zur Vergleichbarkeit und Überprüfung unserer Ergebnisse hinsichtlich der Verwandtschaftsverhältnisse, kombinierten wir in dieser Studie zwei auf PCR-basierende Methoden mit dem Southern-Blotting mit der CARE-2-Sonde. In der Bewertung der einzelnen molekularbiologischen Verfahren belegte die Southern-Hybridisierung den ersten Rang, da sie die beste Diskriminationsfähigkeit unter den Isolaten erzielte. Aufgrund der Vielzahl an generierten Banden konnten wir innerhalb der Spezies *C. albicans* klar unterscheiden, ob die verschiedenen Isolate genetisch identisch oder zumindest verwandt waren. Vergleich man die Anzahl der erzeugten Southern-Banden mit denen eines der PCR-Verfahren, übertraf sie diese in der Menge und in der Stabilität der Banden und bei der Beurteilung der einzelnen Isolate. Allerdings konnten wir dieses Verfahren nur für die Spezies *C. albicans* einsetzen und zudem gestaltete sich das Southern-Blotting als sehr zeitaufwendig und technisch schwierig. An zweiter Stelle, hinsichtlich der Diskrimination, rangierte die RAPD. Mit ihr gelang es zum einen die einzelnen Isolate in die verschiedenen Spezies einzuteilen und zum anderen konnten auch anhand der Bandenmuster genetische Unterschiede innerhalb einer Spezies detektiert werden. Allerdings war das mit dieser Methode erzielte Bandenmuster erheblich spärlicher, als mit dem Southern-Blotting. Hinsichtlich der technischen Umsetzung und des Zeitmanagements erwies sich die RAPD als das einfachste, kostengünstigste und am wenigsten zeitaufwändigste bzw. reproduzierbarste Verfahren. Die IR-PCR kam als zweites PCR-Verfahren hinzu, um weitere genetische Unterschiede, die mit der RAPD nicht detektiert wurden, aufzuzeigen. Die IR-PCR war in ihrer diskriminatorischen Fähigkeit allen anderen Verfahren unterlegen. Zwar stellte auch sie ein schnelles PCR-System dar, allerdings konnte sie in ihrer Reproduzierbarkeit und der Generation von stabilen Banden nicht überzeugen. Ebenso bei der Spezieseinteilung der Stämme sowie in der Unterscheidung unter den Isolaten einer Spezies konnten nicht immer sichere Aussagen getroffen werden.

Als Fazit ist der Kombination aus RAPD-PCR und Southern-Hybridisierung die höchste Aussagekraft zu zuschreiben, da einerseits bei der schnell reproduzierbaren RAPD bereits eine hohe Anzahl an Banden zu generieren war, und andererseits diese mit dem Southern-Blot bestätigt wurden bzw. durch eine noch höhere Anzahl an Banden Aussagen zum Verwandtschaftsverhältnis der Stämme gemacht werden konnten.

Abschließend muss erwähnt werden, dass immer eine Kombination von mindestens zwei Verfahren zur genauen Bestimmung der genotypischen Merkmale einzusetzen ist. Befindet man zwei Isolate anhand des generierten Bandenmusters als genetisch identisch, ist dennoch eher von einer höchstwahrscheinlichen Verwandtschaft der beiden Stämme auszugehen, da mit den verschiedenen Verfahren immer nur Ausschnitte des Genoms verglichen und detektiert werden, und daher geringe genetische Unterschiede nur mittels Sequenzierung auszuschließen sind.

#### **4.4.2. Vergleich genotypischer Charakteristika aller *Candida*-Isolate**

Zur Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse kamen bei *C. albicans* zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz (wie zuvor beschrieben). Zunächst wurden alle 30 Isolate dieser Spezies mit der RAPD zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Um die hiermit erzielten Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Southern-Hybridisierung mit CARE-2 als unabhängiges und hoch diskriminatorisches Verfahren gewählt. Anhand des Vergleichs der erzielten Bandenmuster (Schema siehe unter Material und Methoden) konnten verwandtschaftliche Beziehungen erstellt werden. Zur Typisierung der 15 *C. parapsilosis*-Isolate wählten wir die RAPD mit zwei unterschiedlichen (RPO2 und RSD12) Primern, ferner noch die IR-PCR. Die jeweils fünf Isolate von *C. lusitaniae* und *C. guilliermondii* wurden mit der RAPD (RPO2) und der IR-PCR typisiert. Ebenso die drei restlichen Isolate (*C. glabrata* und *C. krusei*). Wurden einem Patient zwei oder mehrere Isolate zugeordnet, stammten diese von Abstrichen unterschiedlicher Körperregionen. Wurden dann diese Isolate anhand des Schemas als „höchstwahrscheinlich“ verwandt beurteilt, war daraus zu schließen, dass derselbe Erreger an unterschiedlichen anatomischen Regionen anzutreffen war. Bei einem einzelnen besiedelten Patienten einer Klinik konnten keine Rückschlüsse auf die Herkunft des Erregers oder etwaige verwandtschaftliche Beziehungen zu Erregern eines weiteren Patienten derselben Klinik getätigt werden. Auffallend war die Vermutung im Fall der Bielefelder Isolate „FG215“, „FG217“, „FG229“ und der Isolate „FG263/1“, „FG264“ und „FG265“ aus Leipzig (siehe 3.5.1.). Zum Teil lagen hier Isolate von unterschiedlichen Patienten einer Klinik mit demselben Genotyp vor. Anhand der molekularbiologischen Ergebnisse konnten unter Umständen Rückschlüsse auf den Erwerb der Erreger gezogen werden. Die wahrscheinlichste Erklärung liegt im nosokomialen Erwerb der Erreger entweder durch kontaminierte Hände des Personals, durch Gegenstände oder Suspensionen, oder ähnliches. Eine vertikale Transmission

durch die Mutter auf das Kind, oder im Verlauf von Patient zu Patient mittels eines Vektors (z. B. Hände) ist eher unwahrscheinlich. Eine Untersuchung der Umstände des Erregererwerbs (Zimmersituation, Gebrauch von Suspensionen, hygienische Vorkehrungen, etc.) hätte eine nähere Aufklärung der Hintergründe zugelassen, wurden aber in dieser Studie nicht weiter untersucht. Zwar lautete bei der Untersuchung der 15 *C. parapsilosis*-Isolate in keinem Fall die Bewertung „höchstwahrscheinlich“ verwandt, was auf geringere diskriminatorische Fähigkeiten der einzelnen Methoden bzw. des jeweiligen Primers schließen lässt, dennoch konnte auch hier bei den Stämmen „FG74“, „FG76“ und „FG77“ aus Itzehoe (die beiden zuletzt genannten sind Isolate desselben Patienten) ein vorherrschender Genotyp als „wahrscheinlich“ verwandt angesehen werden. Die Auswertung der Isolate „FG307“, „FG308“ und „FG312“ aus Ludwigshafen (die beiden zuerst genannten sind Isolate desselben Patienten) ergab denselben Sachverhalt. Hier könnten dieselben Übertragungsmechanismen, wie bei *C. albicans* zuvor beschrieben, ursächlich sein. Allerdings wurden auch hier die näheren Umstände nicht untersucht. Bei Begutachtung aller *C. lusitaniae*-Isolate wurden zwei weitere Isolate („FG653“ und „FG656/2“ aus Speyer) von verschiedenen Patienten einer Klinik mit einem „höchstwahrscheinlich“ verwandten Genotyp entdeckt. Auch hier lagen keine Angaben über die Umstände des Erwerbs vor und eine horizontale Transmission der Erreger wird als sehr wahrscheinlich angesehen. Die Auswertung der übrigen Isolate ergab teilweise anhand der geringen Fallzahl keine überraschenden Ergebnisse hinsichtlich der Verwandtschaft oder der Transmission.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, einen möglichst repräsentativen Querschnitt der Kolonisationsrate mit Pilzen bei Risikofrühgeborenen mit einem Geburtsgewicht  $\leq 1500\text{g}$  und einem Lebensalter  $\leq 28$  Tagen auf Bundesebene am vorgesehenen Stichtag (29.05.2001) zu erheben. Weiterhin sollten Beziehungen zwischen den Kolonisations- und Infektionsraten und ein Zusammenhang mit möglichen Risikofaktoren für eine Kolonisation mittels verschiedener Fragebögen untersucht werden. Der anschließende experimentelle Teil sollte Aufschlüsse über Resistenzdaten und Verwandtschaftsverhältnisse der *Candida*-Spezies, vor allem bei Stämmen von unterschiedlichen nicht-verwandten Frühgeborenen derselben Klinik, geben. Die

Ergebnisse der Erhebung sollten eine Grundlage zur Entwicklung einheitlicher Präventions- bzw. Therapiestandards schaffen.

Die von uns ermittelte Kolonisationsrate von gemittelt 22,6% lag etwas niedriger, als bisher in der Literatur berichtet. Die Besiedelungsrate in Korrelation zum Geburtsgewicht stieg wie erwartet mit sinkendem Geburtsgewicht. So lag diese mit 34,9% bei den „extremely-low-birth-weight-infants“ (n=126) (<1000 g) um einiges höher. Ein hoch signifikanter Zusammenhang bestand zwischen einer Antibiotikatherapie ( $p < 0,001$ ) und ebenso zwischen der parenteralen Ernährung ( $p = 0,002$ ) und einer damit verbundenen Kolonisation der Frühgeborenen. Keine signifikanten Relationen konnten zwischen dem Geburtsmodus oder dem Geschlecht des Frühgeborenen und einer Kolonisation abgeleitet werden. Bezogen auf den am Abstrichtag dokumentierten Kolonisationsstatus ( $n_{\text{besiedelt}} = 72$ ) mit *Candida*-Spezies trat bei 5,5% der Frühgeborenen eine invasive *Candidiasis* auf. Ein wichtiger Aspekt hierbei war die Tatsache, dass nur bei der Hälfte der Patienten mit systemischer Infektion am Abstrichtag eine Besiedelung vorlag und darüber hinaus nur bei drei Frühgeborenen das ehemals bestimmte Erregerprofil mit dem der invasiven Infektion übereinstimmte.

Hinsichtlich der bestimmten MHK-Werte muss betont werden, dass der überwiegende Teil der Isolate eine gute Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Antimykotika zeigte. Dennoch fanden sich bei fünf verschiedenen Patienten resistente Stämme (drei Isolate *C. albicans* / 5-FC, ein Isolat *C. krusei* / Fluconazol und Ampho B, ein Isolat *C. lusitaniae* / Ampho B, ein Isolat *C. glabrata* / Itraconazol). Eine Besonderheit fiel bei zwei nicht-verwandten Patienten derselben Klinik mit resistenten *C. albicans*-Stämmen (FG263/1 und FG264, FG265 aus Leipzig) auf. Keines der beiden Frühgeborenen entwickelte später eine systemische *Candida*-Infektion, beide wiesen aber mindestens zwei Risikofaktoren (parenterale Ernährung, Antibiose, Katecholamine oder Kortikosteroide) auf.

In den abrundenden Untersuchungen der Verwandtschaftsbeziehungen der Stämme auf molekularbiologischer Ebene erwies sich das Southern-Blotting als das Verfahren mit der höchsten diskriminatorischen Potenz. Auch mit der RAPD konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Am schlechtesten ließen sich verwandtschaftliche Beziehungen der Isolate mit der IR-PCR erkennen. So gelang es zum Beispiel den oben erwähnten resistenten *C. albicans*-Stämme (FG263/1 und FG264, FG265 aus Leipzig) mit dem Southern-Blot eine höchstwahrscheinliche genetische Verwandtschaft zu zuordnen. Nach Ausschluss einer etwaigen Verwandtschaft der dazugehörigen

Frühgeborenen, konnten hieraus Rückschlüsse auf einen nosokomialen Erwerb der Erreger gezogen werden. Ebenso lieferte das Blot-Muster der Bielefelder Isolate „FG215“, „FG217“, „FG229“ den Hinweis auf eine nosokomiale Transmission der *C. albicans*-Isolate.

### Schlussfolgerung

Anhand unseres repräsentativen Studienkollektivs und der Kombination epidemiologischer, mikrobiologischer und molekularbiologischer Erhebungen spiegeln unsere Ergebnisse einen Umriss der Situation auf deutschen Frühgeborenen-intensivstationen wider. Zusammenfassend stellen wir fest, dass die allgemeine Verabreichung einer topischen antimykotischen Prophylaxe durchaus gerechtfertigt werden kann, da bei einer vorliegenden Kolonisation, ein sehr hoher Anteil der Frühgeborenen einen oralen bzw. analen Soor erwirbt, jedoch die Korrelation mit der Entwicklung einer systemischen *Candida*-Infektion zu einem späteren Zeitpunkt als eher gering gewertet wird, natürlich immer in Beachtung der individuellen Risikoabschätzung und einer möglichen Resistenzentwicklung. Hinsichtlich des Erwerbs systemischer *Candida*-Infektionen sollte eher die Einführung einer systemischen Prophylaxe bei kolonisierten Frühgeborenen  $\leq 1500g$  ins Zentrum der Diskussionen rücken. Bei nachfolgenden Studien sollte der Mangel dieser Arbeit, hinsichtlich des Fehlens einer erneuten Erhebung des Kolonisationsstatus im Follow-up aller noch hospitalisierten Patienten und eine molekularbiologische Differenzierung aller Isolate von Patienten mit systemischer Infektion, behoben werden, um eine Veränderung im Kolonisationsstatus, des Erregerprofils sowie mögliche Resistenzenstehungen zu detektieren. Darüber hinaus sollten klinische Daten in noch größerem Ausmaß an Beachtung finden.

Die zuvor erwähnte Problematik macht deutlich, dass weitere Untersuchungen hinsichtlich der Entstehung von Resistenzmechanismen, Erregertransmissionen und -profil, Erarbeitung von Therapiestrategien der *Candidiasis* dringend Ziel weiterer Studien sein muss.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Leslie T.Mathaba, John R.Warmington, and Kathleen M.Franklyn** (1993). A rapid technique for the isolation of DNA from clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal of Microbiological Methods*, 17, 17-25.
2. **Fridkin SK and Jarvis WR** (1996). Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev*, 9, 499-511.
3. **Baley, J. E., Kliegman, R. M., Boxerbaum, B., and Fanaroff, A. A.** (1986). Fungal colonization in the very low birth weight infant. *Pediatrics*, 78, 225-232.
4. **Rodriguez-Nunez, A.** (2001). Incidence and mortality of proven invasive *Candida* infections in pediatric intensive care patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 22, 477-478.
5. **Walsh, T. J., Gonzalez, C., Lyman, C. A., Chanock, S. J., and Pizzo, P. A.** (1996). Invasive fungal infections in children: recent advances in diagnosis and treatment. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.*, 11, 187-290.
6. **Baley, J. E.** (1991). Neonatal candidiasis: the current challenge. *Clin. Perinatol.*, 18, 263-280.
7. **Saiman, L.** (15-9-1998). Neonatal Candidiasis. *Clinical Microbiology Newsletter*, 20, 149-152.
8. **Rowen, J. L.** (17-9-2000). Serious Fungal Infections in Neonates and Children. 15, 524-524.
9. **Shin JH, Suh SP, Ryang DW., Kee SJ, Song JW, and Shin DH** (2001). Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1258-1263.
10. **Stewart Scherer and Paul T.Mage** (1990). Genetics of *Candida albicans*. *Microbiological Reviews*, 54, 226-241.
11. **Kossoff, E. H., Buescher, E. S., and Karlowicz, M. G.** (1998). Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 17, 504-508.
12. **Santos, P., Hochenfellner, F., Castro, G., Cordoba, S., Casalis, A., Vivot, W., Ruboglio, E., and Rodero, L.** (17-9-2000). Neonatal Candidosis: Nosocomial Transmission of *Candida albicans*. 15, 355-355.
13. **Reiss E, Yamaguchi H., Uchida K, Sullivan D, Shibuya K, Sarfati J, Paris S, Naoe S, Murayama SY, Morrison CJ, Makimura K, Lortholary J, Latge JP, Hanazawa R,**

- Debeaupuis JP, Coleman D, Chazalet V, Bruker G, and Tanaka K (1998). Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Medical Mycology*, 36, 249-257.
14. **Saiman, L., Ludington, E., Pfaller, M., Rangel-Frausto, S., Wiblin, R. T., Dawson, J., Blumberg, H. M., Patterson, J. E., Rinaldi, M., Edwards, J. E., Wenzel, R. P., and Jarvis, W.** (2000). Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 19, 319-324.
  15. **Harms, K., Herting, E., Schiffmann, J. H., and Speer, C. P.** (1992). Candida infections in premature infants weighing less than 1,500 g. Mucocutaneous colonization and incidence of systemic infections. *Monatsschr. Kinderheilkd.*, 140, 633-638.
  16. **Odds, F. C.** (1988). *Candida and Candidosis*. London: Bailliere Tindal ,
  17. **Soll DR, Galask R, Schmid J, Hanna C, Mac K, and Morrow B** (1991). Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida* spp. carried in different anatomical locations of the same healthy women. *J Clin Microbiol*, 29, 1702-1710.
  18. **Rangel-Frausto, M. S., Wiblin, T., Blumberg, H. M., Saiman, L., Patterson, J., Rinaldi, M., Pfaller, M., Edwards, J. E., Jr., Jarvis, W. , Dawson, J., and Wenzel, R. P.** (1999). National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin. Infect. Dis.*, 29, 253-258.
  19. **Reich, J. D., Huddleston, K., Jorgensen, D., and Berkowitz, F. E.** (1997). Neonatal *Torulopsis glabrata* fungemia. *South. Med. J.*, 90, 246-248.
  20. **Phillips, J. R. and Karlowicz, M. G.** (1997). Prevalence of *Candida* species in hospital-acquired urinary tract infections in a neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 16, 190-194.
  21. **Finkelstein, R., Reinhertz, G., Hashman, N., and Merzbach, D.** (1993). Outbreak of *Candida tropicalis* fungemia in a neonatal intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 14, 587 -590.
  22. **Lee, B. E., Cheung, P. Y., Robinson, J. L., Evanochko, C., and Robertson, C. M.** (1998). Comparative study of mortality and morbidity in premature infants (birth weight, < 1,250 g) with candidemia or candidal meningitis. *Clin. Infect. Dis.*, 27, 559-565.
  23. **Rowen, J. L., Rench, M. A., Kozinetz, C. A., Adams, J. M., Jr., and Baker, C. J.** (1994). Endotracheal colonization with *Candida* enhances risk of systemic candidiasis in very low birth weight neonates. *J. Pediatr.*, 124, 789-794.

24. **Saxen, H., Virtanen, M., Carlson, P., Hoppu, K., Pohjavuori, M., Vaara, M., Vuopio-Varkila, J., and Peltola, H.** (1995). Neonatal *Candida parapsilosis* outbreak with a high case fatality rate. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 14, 776-781.
25. **Karłowicz, M. G., Hashimoto, L. N., Kelly, R. E., Jr., and Buescher, E. S.** (2000). Should central venous catheters be removed as soon as candidemia is detected in neonates? *Pediatrics*, 106, E63.
26. **Xanthou, M., Valassi-Adam, E., Kintsonidou, E., and Matsaniotis, N.** (1975). Phagocytosis and killing ability of *Candida albicans* by blood leucocytes of healthy term and preterm babies. *Arch. Dis. Child*, 50, 72-75.
27. **Kicklighter SD, Springer SC, Cox T, Hulsey TC, and Turner RB** (2001). Fluconazole for prophylaxis against candidal rectal colonization in the very low birth weight infant. *Pediatrics*, 107, 293-298.
28. **Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ, and SENTRY Participants Group** (2002). Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *J Clin Microbiol*, 40, 852-856.
29. **Hostetter, M. K.** (1996). New insights into candidal infections. *Adv. Pediatr.*, 43, 209-230.
30. **Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, and Coleman DC** (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, 141, 1507-1521.
31. **Gil-Lamaignere C, Roilides E, Hacker J, and Muller FM** (2003). Molecular typing for fungi—a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect*, 9, 172-185.
32. **Benjamin, D. K., Jr., Ross, K., McKinney, R. E., Jr., Benjamin, D. K., Auten, R., and Fisher, R. G.** (2000). When to suspect fungal infection in neonates: A clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Pediatrics*, 106, 712-718.
33. **Evans, N. J. and Rutter, N.** (1986). Development of the epidermis in the newborn. *Biol. Neonate*, 49, 74-80.
34. **Moro, M. L., Maffei, C., Manso, E., Morace, G., Polonelli, L., and Biavasco, F.** (1990). Nosocomial outbreak of systemic candidosis associated with parenteral nutrition. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 11, 27-35.
35. **van den Anker, J. N., van Popele, N. M., and Sauer, P. J.** (1995). Antifungal agents in neonatal systemic candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1391-1397.



36. **Leibovitz, E., Flidel-Rimon, O., Juster-Reicher, A., Amitay, M., Miskin, A., Barak, Y., and Mogilner, B.** (1997). Sepsis at a neonatal intensive care unit: a four-year retrospective study (1989-1992). *Isr. J. Med. Sci.*, 33, 734-738.
37. **Welbel, S. F., McNeil, M. M., Kuykendall, R. J., Lott, T. J., Pramanik, A., Silberman, R., Oberle, A. D., Bland, L. A., Agüero, S., Arduino, M., Crow, S., and Jarvis, W. R.** (1996). *Candida parapsilosis* bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: epidemiologic and laboratory confirmation of a common source outbreak. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 15, 998 -1002.
38. **Sherertz, R. J., Gledhill, K. S., Hampton, K. D., Pfaller, M. A., Givner, L. B., Abramson, J. S., and Dillard, R. G.** (1992). Outbreak of *Candida* bloodstream infections associated with retrograde medication administration in a neonatal intensive care unit. *J. Pediatr.*, 120, 455-461.
39. **Faix, R. G., Kovarik, S. M., Shaw, T. R., and Johnson, R. V.** (1989). Mucocutaneous and invasive candidiasis among very low birth weight (less than 1,500 grams) infants in intensive care nurseries: a prospective study. *Pediatrics*, 83, 101-107.
40. **Butler, K. M. and Baker, C. J.** (1988). *Candida*: an increasingly important pathogen in the nursery. *Pediatr. Clin. North Am.*, 35, 543-563.
41. **Weese-Mayer, D. E., Fondriest, D. W., Brouillette, R. T., and Shulman, S. T.** (1987). Risk factors associated with candidemia in the neonatal intensive care unit: a case-control study. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 6, 190-196.
42. **Solomon, S. L., Khabbaz, R. F., Parker, R. H., Anderson, R. L., Geraghty, M. A., Furman, R. M., and Martone, W. J.** (1984). An outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition. *J. Infect. Dis.*, 149, 98-102.
43. **Baley, J. E., Kliegman, R. M., and Fanaroff, A. A.** (1984). Disseminated fungal infections in very low-birth-weight infants: clinical manifestations and epidemiology. *Pediatrics* , 73, 144-152.
44. **Faix, R. G.** (1984). Systemic *Candida* infections in infants in intensive care nurseries: high incidence of central nervous system involvement. *J. Pediatr.*, 105, 616-622.
45. **Huang, Y. C., Lin, T. Y., Leu, H. S., Peng, H. L., Wu, J. H., and Chang, H. Y.** (1999). Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. *Infection*, 27, 97-102.
46. **Herruzo-Cabrera, R., De Lope, C., Fernandez-Arjona, M., and Rey-Calero, J.** (1995). Risk factors of infection and digestive tract colonization by *Candida* spp. in a neonatal intensive care unit. *Eur. J. Epidemiol.*, 11, 291-295.

47. **Vaudry, W. L., Tierney, A. J., and Wenman, W. M.** (1988). Investigation of a cluster of systemic *Candida albicans* infections in a neonatal intensive care unit. *J. Infect. Dis.*, 158, 1375-1379.
48. **Gaynes, R. P., Edwards, J. R., Jarvis, W. R., Culver, D. H., Tolson, J. S., and Martone, W. J.** (1996). Nosocomial infections among neonates in high-risk nurseries in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Pediatrics*, 98, 357-361.
49. **Rowen, J. L., Atkins, J. T., Levy, M. L., Baer, S. C., and Baker, C. J.** (1995). Invasive fungal dermatitis in the < or = 1000-gram neonate. *Pediatrics*, 95, 682-687.
50. **van den Anker, J. N.** (1992). Treatment of neonatal *Candida albicans* septicemia with itraconazole. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 11, 684-685.
51. **Melville, C., Kempley, S., Graham, J., and Berry, C. L.** (1996). Early onset systemic *Candida* infection in extremely preterm neonates. *Eur. J. Pediatr.* , 155, 904-906 .
52. **Huang, Y. C., Lin, T. Y., Peng, H. L., Wu, J. H., Chang, H. Y., and Leu, H. S.** (1998). Outbreak of *Candida albicans* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Scand. J. Infect. Dis.*, 30, 137-142.
53. **Friedman, S., Richardson, S. E., Jacobs, S. E., and O'Brien, K.** (2000). Systemic *Candida* infection in extremely low birth weight infants: short term morbidity and long term neurodevelopmental outcome. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 19, 499-504.
54. **Khoory, B. J., Vino, L., Dall'Agnola, A., and Fanos, V.** (1999). *Candida* infections in newborns: a review. *J. Chemother.*, 11, 367-378.
55. **Johnson, D. E., Thompson, T. R., Green, T. P., and Ferrieri, P.** (1984). Systemic candidiasis in very low-birth-weight infants (less than 1,500 grams). *Pediatrics*, 73, 138-143.
56. **Baley, J. E., Kliegman, R. M., and Fanaroff, A. A.** (1984). Disseminated fungal infections in very low-birth-weight infants: therapeutic toxicity. *Pediatrics*, 73, 153-157.
57. **Reef, S. E., Lasker, B. A., Butcher, D. S., McNeil, M. M., Pruitt, R., Keyserling, H., and Jarvis, W. R.** (1998). Nonperinatal nosocomial transmission of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: prospective study. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1255-1259.
58. **Alteras, I. and Aryeli, J.** (31-10-1980). The incidence of *Candida albicans* in the last day of pregnancy and the first days of the new born. *Mycopathologia*, 72, 85-87.
59. **Betremieux, P., Chevrier, S., Quindos, G., Sullivan, D., Polonelli, L., and Guiguen, C.** (1994). Use of DNA fingerprinting and biotyping methods to study a *Candida albicans* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 13, 899-905.

60. **Reagan, D. R., Pfaller, M. A., Hollis, R. J., and Wenzel, R. P.** (1995). Evidence of nosocomial spread of *Candida albicans* causing bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 21, 191-194.
61. **Solomon, S. L., Alexander, H., Eley, J. W., Anderson, R. L., Goodpasture, H. C., Smart, S., Furman, R. M., and Martone, W. J.** (1986). Nosocomial fungemia in neonates associated with intravascular pressure- monitoring devices. *Pediatr. Infect. Dis.*, 5, 680-685.
62. **McCray E, Solomon SL, Bond WW, Martone WJ, O'Day D, and Rampell N** (1986). Outbreak of *Candida parapsilosis* endophthalmitis after cataract extraction and intraocular lens implantation. *J Clin Microbiol*, 24, 625-628.
63. **Faix, R. G., Finkel, D. J., Andersen, R. D., and Hostetter, M. K.** (1995). Genotypic analysis of a cluster of systemic *Candida albicans* infections in a neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 14, 1063-1068.
64. **Muller, F. M., Elstner, S., Schloesser, R. L., Groll, A. H., and Roos, R.** (2001). Systemic fungal infections in german neonatal intensive care units (NICU'S). ESPED survey. 7th Congress of the European Confederation of Medical Mycology ECMM. *Mycoses*, 44.
65. **Ruiz-Diez, B., Martinez, V., Alvarez, M., Rodriguez-Tudela, J. L., and Martinez-Suarez, J. V.** (1997). Molecular tracking of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: long-term colonizations versus catheter-related infections. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 3032-3036.
66. **Krcmery V, Laho L, Huttova M, Ondrusova A, Kralinsky K, Pevalova L, Dluholucky S, Pisarcikova M, Hanzen J, Filka J, Sejnova D, Liskova A, Purgelova A, Szovenyova Z, and Koren P** (2002). Aetiology, antifungal susceptibility, risk factors and outcome in 201 fungaemic children: data from a 12-year prospective national study from Slovakia. *J Med Microbiol*, 51, 110-116.
67. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** (1997). Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Approved standard M27-A*.
68. **Khatib R, Baran J Jr., Oney LA, Sturm L, Riederer KM, and Thirumoorthi MC** (1998). Clustering of *Candida* infections in the neonatal intensive care unit: concurrent emergence of multiple strains simulating intermittent outbreaks. *Pediatr Infect Dis J*, 17, 130-134.
69. **Van Belkum A, Melchers W, de Pauw BE, Scherer S, Quint W, and Meis JF** (1994). Genotypic characterization of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. *J Infect Dis*, 169, 1062-1070.

70. **Lockhart SR, Reed BD, Pierson CL, and Soll DR** (1996). Most frequent scenario for recurrent *Candida* vaginitis is strain maintenance with "substrain shuffling": demonstration by sequential DNA fingerprinting with probes Ca3, C1, and CARE2. *J Clin Microbiol*, 34, 767-777.
71. **Voss A, Doebbeling BN., Rhine-Chalberg J, Hollis RJ, and Pfaller MA** (1995). Investigation of *Candida albicans* transmission in a surgical intensive care unit cluster by using genomic DNA typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 576-580.
72. **Mending W, Schonian G., Presber W, Gantenberg R, Gutschmidt J, and Pinto De Andrade M** (2000). Strain specificity of yeasts isolated from different locations of women suffering from vaginal candidosis, and their partners. *Mycoses*, 43, 387-392.
73. **Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M, and Chanock SJ** (1995). PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *J Clin Microbiol*, 33, 3216-3220.
74. **Hunter PR.** (1991). A critical review of typing methods for *Candida albicans* and their applications. *Crit Rev Microbiol*, 17, 417-434.
75. **Lee W, Matthews R., and Burnie J** (1986). Fingerprinting *Candida albicans*. *J Immunol Methods*, 93, 177-182.
76. **Muller FM, Hacker J., Harmsen D, and Lischewski A** (1999). Standardized molecular typing. *Mycoses*, 42, 69 -72.
77. **Otero L, Mendez FJ., Carreno F, Vazquez S, Palacio V, and Vazquez F** (1995). Comparison of seven phenotyping methods for *Candida albicans*. *Eur J Epidemiol*, 11, 221-224.
78. **Tomsikova A, Kotal L., and Vrana D** (1990). Biotyping of *Candida* strains with regard to the epidemiology of candidosis. A practical approach. *Mycoses*, 33, 527-537.
79. **Tsang PC, , Porter SR., Scully C, Schmidt-Westhausen A, Reichart PA, McCulloug M, Philipsen HP, and Samaranayake LP** (1995). Biotypes of oral *Candida albicans* isolates in human immunodeficiency virus-infected patients from diverse geographic locations. *Journal of Oral Pathology Medicine* , 24, 32-36.
80. **Pfaller MA, Wenzel RP., Huston B, Hollis R, and Cabezudo I** (1990). The use of biotyping and DNA fingerprinting in typing *Candida albicans* from hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 13, 481-489.
81. **Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T, and Michel-Briand Y** (1994). Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol*, 32, 1115-1118.

82. **Sullivan D, Bennett D, Henman M, Harwood P, Flint S, Mulcahy F, Shanley D, and Coleman D** (1993). Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *J Clin Microbiol*, 31, 2124-2133.
83. **D.J.Sullivan, D.C.Coleman, D.B.Shanley, Désirée E.Bennett, Lorraine C.O'Neill, G.P.Moran, and M.C.Henman** (1996). Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 44, 399-408.
84. **N Akopyanz, NO Bukanov, TU Westblom, S Kresovich, and DE Berg** (1992). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 20, 5137-5142.
85. **Dassanayake RS and Samaranayake LP.** (2000). Characterization of the genetic diversity in superficial and systemic human isolates of *Candida parapsilosis* by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *APMIS*, 108, 153-160.
86. **Versalovic J, Koeuth T, and Lupski JR** (25-12-1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 19, 6823-6831.
87. **Lasker BA, Page LS, Lott TJ, and Kobayashi GS.** (1992). Isolation, characterization, and sequencing of *Candida albicans* repetitive element 2. *Gene*, 116, 51-57.
88. **Leibovitz, E., Iuster-Reicher, A., Amitai, M., and Mogilner, B.** (1992). Systemic candidal infections associated with use of peripheral venous catheters in neonates: a 9-year experience. *Clin. Infect. Dis.*, 14, 485-491.
89. **Stoll, B. J., Gordon, T., Korones, S. B., Shankaran, S., Tyson, J. E., Bauer, C. R., Fanaroff, A. A., Lemons, J. A., Donovan, E. F., Oh, W., Stevenson, D. K., Ehrenkranz, R. A., Papile, L. A., Verter, J., and Wright, L. L.** (1996). Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J. Pediatr.*, 129, 63-71.
90. **Campbell, J. R., Zaccaria, E., and Baker, C. J.** (2000). Systemic candidiasis in extremely low birth weight infants receiving topical petrolatum ointment for skin care: a case-control study. *Pediatrics*, 105, 1041-1045.
91. **Huang, Y. C., Li, C. C., Lin, T. Y., Lien, R. I., Chou, Y. H., Wu, J. L., and Hsueh, C.** (1998). Association of fungal colonization and invasive disease in very low birth weight infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 17, 819-822.

92. **Tortorano A.M., Peman J., Klingspor L., Bernhardt H., Kibbler C., Faure O., Biraghi E., Canton E., Zimmermann K., Ainscough S., and Grillot R.** (19-6-2001). 7th Congress of the European Confederation of Medical Mycoloy-ECMM. 44, 76-76.
93. **el Mohandes, A. E., Johnson-Robbins, L., Keiser, J. F., Simmens, S. J., and Aure, M. V.** (1994). Incidence of *Candida parapsilosis* colonization in an intensive care nursery population and its association with invasive fungal disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 13, 520-524.
94. **Ronnestad, A., Abrahamsen, T. G., Gaustad, P., and Finne, P. H.** (1998). Blood culture isolates during 6 years in a tertiary neonatal intensive care unit. *Scand. J. Infect. Dis.*, 30, 245-251.
95. **Kaufman, D., Boyle, R., Hazen, K. C., Patrie, J. T., Robinson, M., and Donowitz, L. G.** (6-12-2001). Fluconazole prophylaxis against fungal colonization and infection in preterm infants. *N. Engl. J. Med.*, 345, 1660-1666.
96. **Schwesinger, G.** (1999). [Disseminated candidiasis in premature twins. Case report]. *Mycoses*, 42 Suppl 1, 60-62.
97. **Sood S, Majumdar T, Chatterjee A, Sethi S, Dutta K, and Banerjee U** (1998). Disseminated candidosis in premature twins. *Mycoses*, 41, 417-419.
98. **Karłowicz, M. G., Giannone, P. J., Pestian, J., Morrow, A. L., and Shults, J.** (2000). Does candidemia predict threshold retinopathy of prematurity in extremely low birth weight ( $\leq 1000$  g) neonates? *Pediatrics*, 105, 1036-1040.
99. **Faix, R. G.** (1992). Invasive neonatal candidiasis: comparison of *albicans* and *parapsilosis* infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 11, 88-93.
100. **Fernandez, M., Moylett, E. H., Noyola, D. E., and Baker, C. J.** (2000). Candidal meningitis in neonates: a 10-year review. *Clin. Infect. Dis.*, 31, 458-463.
101. **Juster-Reicher, A., Leibovitz, E., Linder, N., Amitay, M., Flidel-Rimon, O., Even-Tov, S., Mogilner, B., and Barzilai, A.** (2000). Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of neonatal candidiasis in very low birth weight infants. *Infection*, 28, 223-226.
102. **Leibovitz, E.** (2001). 7th Congress of the European Confederation of Medical Mycoloy-ECMM. 44, 40-41.
103. **Lejbkovicz, F., Barzilai M., Kudinsky R., and Predescu S.** (2001). 7th Congress of the European Confederation of Medical Mycoloy-ECMM. 44, 41-41.
104. **Sastre, J. L., Cotallo, C., Colomer, F., and Waskin, H.** (2000). Invasive Neonatal Candidosis in Spain. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 15, 383-383.

105. **Shattuck KE, Cochran CK, Zabransky RJ, Davis JC, Malloy MH., and Pasarell L** (1996). Colonization and infection associated with *Malassezia* and *Candida* species in a neonatal unit. *J Hosp Infect*, 34, 123-129.
106. **Vazquez, J. A., Boikov, D., Boikov, S. G., and Dajani, A. S.** (1997). Use of electrophoretic karyotyping in the evaluation of *Candida* infections in a neonatal intensive-care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 18, 32-37.
107. **Rowen, J. L., Tate, J. M., Nordoff, N., Passarell, L., and McGinnis, M. R.** (1999). *Candida* isolates from neonates: frequency of misidentification and reduced fluconazole susceptibility. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 3735-3737.
108. **Huttova, M., Kralinsky, K., Horn, J., Marinova, I., Iligova, K., Fric, J., Spanik, S., Filka, J., Uher, J., Kurak, J., and Krcmery, V., Jr.** (1998). Prospective study of nosocomial fungal meningitis in children-report of 10 cases. *Scand. J. Infect. Dis.*, 30, 485-487.
109. **Huttova, M., Hartmanova, I., Kralinsky, K., Filka, J., Uher, J., Kurak, J., Krizan, S., and Krcmery, V., Jr.** (1998). *Candida* fungemia in neonates treated with fluconazole: report of forty cases, including eight with meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 17, 1012-1015.
110. **Narang A, Agrawal P, Chakraborti A, and Kumar P** (1996). Fluconazole in the management of neonatal systemic candidiasis. *Indian Pediatr*, 33, 823-826.
111. **Trubenova D, Viragova S, Pilipcinec E, Danko J, Svicky E, and Tkacikova L.** (2001). *Candidaemia* in cancer patients and in children in a neonatal intensive care unit. *Folia Microbiol (Praha)*, 46, 161-164.
112. **Shattuck, K. E., Cochran, C. K., Zabransky, R. J., Pasarell, L., Davis, J. C., and Malloy, M. H.** (1996). Colonization and infection associated with *Malassezia* and *Candida* species in a neonatal unit. *J. Hosp. Infect.*, 34, 123-129.
113. **Sims ME, Yoo Y, You H, Salminen C, and Walther FJ** (1988). Prophylactic oral nystatin and fungal infections in very-low-birthweight infants. *Am J Perinatol*, 5, 33-36.
114. **Neely MN and Schreiber JR** (2001). Fluconazole prophylaxis in the very low birth weight infant: not ready for prime time. *Pediatrics*, 107, 404-405.
115. **Weems, J. J., Jr., Chamberland, M. E., Ward, J., Willy, M., Padhye, A. A., and Solomon, S. L.** (1987). *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1029-1032.

116. **Singh K, Chakrabarti A, Narang A, and Gopalan S.** (1999). Yeast colonisation & fungaemia in preterm neonates in a tertiary care centre. *Indian J Med Res.*, 110, 169-173.
117. **Daftary, A. S., Patole, S. K., and Whitehall, J. S.** (1999). Intracardiac fungal masses in high-risk neonates: clinical observations. *Acta Paediatr.*, 88, 1009-1013.
118. **Bryant, K., Maxfield, C., and Rabalais, G.** (1999). Renal candidiasis in neonates with candiduria. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 18, 959-963.
119. **Darmstadt, G. L., Dinulos, J. G., and Miller, Z.** (2000). Congenital cutaneous candidiasis: clinical presentation, pathogenesis, and management guidelines. *Pediatrics*, 105, 438-444.
120. **Ray, T. L. and Wuepper, K. D.** (1976). Experimental cutaneous candidiasis in rodents. *J. Invest Dermatol.*, 66, 29-33.
121. **Warris, A., Semmekrot, B. A., and Voss, A.** (2001). Candidal and bacterial bloodstream infections in premature neonates: a case-control study. *Med. Mycol.*, 39, 75-79.
122. **Butler, K. M., Rench, M. A., and Baker, C. J.** (1990). Amphotericin B as a single agent in the treatment of systemic candidiasis in neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 9, 51-56.
123. **NCCLS** (2002).
124. **Nguyen MH, Peacock JE Jr., Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, and Yu VL** (1996). The changing face of candidemia: emergence of non-Candida albicans species and antifungal resistance. *Am J Med*, 100, 617-623.
125. **Kovacicova G, Krupova Y, Lovaszova M, Roidova A, Trupl J, Liskova A, Hanzen J, Milosovic P, Lamosova M, Macekova L, Szovenyiova Z, Purgelova A, Obertik T, Bille J, and Krcmery V** (2000). Antifungal susceptibility of 262 bloodstream yeast isolates from a mixed cancer and non-cancer patient population: is there a correlation between in-vitro resistance to fluconazole and the outcome of fungemia? *J Infect Chemother*, 6, 216-212.
126. **McCullough MJ, Stevens DA., and Clemons KV** (1999). Molecular and phenotypic characterization of genotypic Candida albicans subgroups and comparison with Candida dubliniensis and Candida stellatoidea. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 417-421.
127. **Huang, Y. C., Kao, H. T., Lin, T. Y., and Kuo, A. J.** (2001). Antifungal susceptibility testing and the correlation with clinical outcome in neonatal candidemia. *Am. J. Perinatol.*, 18, 141-146.



128. **King D, Rhine-Chalberg J, Pfaller MA, Moser SA, and Merz WG.** (1995). Comparison of four DNA-based methods for strain delineation of *Candida lusitanae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1467-1470.
129. **Merz WG.** (1984). *Candida lusitanae*: frequency of recovery, colonization, infection, and amphotericin B resistance. *J Clin Microbiol*, 20, 1194-1195.
130. **Barchiesi F, Di Francesco LF, Arzeni D, Caselli F, Simonetti O, Cellini A, Giacometti A, Offidani AM, and Scalise G.** (2001). Electrophoretic karyotyping and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* clinical isolates causing deep and superficial fungal infections. *Mycopathologia*, 149, 117-121.
131. **PF.Lehmann, BA.Lasker, and D.Lin** (1992). Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 3249-3254.
132. **Vrioni G and Matsiota-Bernard P.** (2001). Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. *J Infect*, 42, 50-56.
133. **Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, and Lehmann PF.** (1995). Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1815-1821.
134. **Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP, O'Neill LC, Bennett DE, Shanley DB, and Coleman DC.** (1996). Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 44, 399-408.
135. **Tyler KD, Wang G, Tyler SD, and Johnson WM** (1997). Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA-fingerprinting of representative bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 339-346.
136. **Van Belkum A, Kluytmans J, Van Leeuwen W, and et al.** (1995). Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1537-1547.
137. **Lockhart SR, Joly S, Pujol C, Sobel JD, Pfaller MA, and Soll DR.** (1997). Development and verification of fingerprinting probes for *Candida glabrata*. *Microbiology*, 143, 3733-3746.
138. **Luigi Falconi Di Francesco, Francesco Barchiesi, Francesca Caselli, Oscar Cirioni, and Giorgio Scalise** (1999). Comparison of four methods for DNA typing of clinical isolates of *Candida glabrata*. *Mycology*, 48, 955-963.
139. **Pujol C, Soll DR., Tibayrenc M, Noel S, Lockhart SR, and Joly S** (1997). Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA

- probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2348-2358.
140. **Emmanuelle Bart-Delabesse, Françoise Dromer, Alex van Belkum, Nicole Lioret, Jean-Louis Poirot, Wil Goessens, and Hanneke van Deventer** (1995). Contribution of Molecular Typing Methods and Antifungal Susceptibility Testing to the Study of a Candidemia Cluster in a Burn Care Unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 3278-3283.
141. **Muller FM, M Weig, J Peter, and T J Walsh** (2000). Azole cross-resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in Clinical *Candida albicans* isolates from HIV-infected children with oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother*, 46, 338-340.
142. **Elstner, S.** (2003). Systemische Pilzinfektionen bei Früh- und Neugeborenen in Deutschland. Kinder- und Poliklinik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 1-102.

## 7. Anhang

**MULTIZENTRISCHE PUNKT-PRÄVALENZ ERHEBUNG  
DER KOLONISIERUNG MIT PILZEN  
BEI INTENSIVMEDIZINISCH BEHANDELTEN FRÜHGEBORENEN  
MIT EINEM GEBURTSGEWICHT VON  $\leq 1500$  GRAMM UND EINEM  
LEBENSALTER  $\leq 28$  TAGE**

### FLUSSSCHEMA

*Postanschrift der zentralen Studienleitung:*

Dr.med. Frank-Michael C. Müller

Universitäts-Kinderklinik

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg

Tel.: 0931-201-3409/3728 Fax: 0931-201-3720 Email: [fmmueller@mail.uniwuertzburg.de](mailto:fmmueller@mail.uniwuertzburg.de)

<b>Vor Studienbeginn</b>	Vervollständigung des zugesandten Fragebogens	Bitte den Bogen per Post oder Fax an die Studienleitung senden
	Votum der Ethik-Kommission Würzburg: vom 19. März 2001	Kopie des Votums an Studienzentren senden
	Aufklärung und Einwilligung der Sorgeberechtigten	
<b>Studien-Stichtag</b>	Überprüfung der Einschlusskriterien	
	Vergabe einer Studiennummer an <i>alle</i> auf Station liegenden Frühgeborenen mit einem GG $\leq 1500$ g und einem Lebensalter $\leq 28$ Tage (Formblatt 1, Patientenregister); ggf. Grund für Nichtteilnahme bei nicht eingeschlossenen Patienten notieren ggf. ein zweites Formblatt benutzen	

	Komplettieren Sie bitte für alle in Formblatt 1 aufgeführten Patienten die in Formblatt 2 (Patientendaten) abgefragten Informationen; benutzen Sie ggf. ein zweites Formblatt. Kopie von Formblatt 2 für die eigenen Unterlagen.	
	Entnahme von Rektal- und Rachenabstrich bzw. Trachealsekret; Probenröhrchen sind mit der dem individuellen Patienten zugeteilten Studiennummer zu versehen	
	Probenröhrchen in verschließbarem Plastikbeutel geben	Proben und Originale von Formblatt 2 an die Studienzentrale senden
	Formblatt 1 (Patientenregister) zusammen mit allen anderen Studienunterlagen vor unbefugtem Zugriff gesichert aufbewahren.	
<b>Follow-up (60 Tage nach Studien-Stichtag)</b>	Zusendung von Formblatt 3 und 4 von zentraler Studienleitung	
	Durchsicht aller Krankenunterlagen und Vervollständigung von Formblatt 3 (Follow-up) für alle in Formblatt 1 (Patientenregister) aufgeführten Patienten; ggf. ein zweites Formblatt benutzen.	
	Komplettierung von Formblatt 4 (Dokumentationsbogen) für alle Patienten mit invasiver Pilzinfektion; ggf. ein zweites Formblatt benutzen.	
	Isolate von in Formblatt 4 aufgeführten Patienten mit invasiven Pilzinfektionen sammeln	
	Formblatt 3 und 4 für eigene Unterlagen kopieren; alle Unterlagen 5 Jahre aufbewahren	Formblätter 3 und 4 sowie Pilzisolat an die zentrale Studienleitung in Würzburg senden

**ALLGEMEINER FRAGEBOGEN:**

**Name der Kontaktperson:**

**Institution:**

**Adresse:**

**Telefon:**

**Fax:**

**E-mail:**

1. Betreut Ihre Abteilung intensivpflichtige Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht  $\leq 1500\text{g}$

*ja*

*nein*

(bitte Zutreffendes einkreisen)

2. Anzahl der Betten für intensivpflichtige Neu- und Frühgeborene:

3. Anzahl der Betten für andere kranke Früh- und Neugeborene:

4. Gesamtzahl der Betten der Klinik:

5. Setzen Sie antimykotische Substanzen zur Prophylaxe ein (bitte Zutreffendes einkreisen):

*ja*

*nein*

Falls ja, geben Sie bitte die Substanzen an:

6. Kommt Fluconazol in Ihrer Abteilung in prophylaktischer bzw. therapeutischer Indikation zum Einsatz

(bitte kreisen Sie Zutreffendes ein)

*ja*

*nein*

Falls ja, schätzen Sie, wieviele Patienten in den letzten 12 Monaten Fluconazol erhalten haben (bitte kreisen Sie Zutreffendes ein):

1-2

3-5

6-10

11-20

21-30

$\geq 31$

7. An der Studie nehme ich teil

(bitte Zutreffendes einkreisen):

*ja*

*nein*

**BITTE SENDEN SIE DEN AUSGEFÜLLTEN FRAGEBOGEN ZURÜCK AN:**

Dr.med. Frank-Michael C. Müller

Universitäts-Kinderklinik, Julius Maximilians-Universität Würzburg

Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg

Tel.: 0931-201-3409/3728

Fax: 0931-201-3720

E-mail: fmmueller@mail.uni-wuerzburg.de

**FORMBLATT 1 (PATIENTENREGISTER)**

**" MULTIZENTRISCHE PUNKT-PRÄVALENZ ERHEBUNG  
DER KOLONISATION MIT PILZEN "**

**STUDIENZENTRUM / STUDIENLEITER:**

**NUMMER DES STUDIENZENTRUMS:**

<b>Patienten-Nummer</b>	<b>Name</b>	<b>Geburtsdatum</b>	<b>Eingeschlossen (ja / nein [falls nein: Grund])</b>

**DIESES FORMBLATT IST ESSENTIELL UND FÜR IHRE UNTERLAGEN BESTIMMT. ES DIEN T DER PATIENTEN-IDENTIFIKATION FÜR DAS FOLLOW-UP UND IST GESICHERT AUFZUBEWAHREN.**

**FORMBLATT 2 (PATIENTENDATEN)**

*" MULTIZENTRISCHE PUNKT-PRÄVALENZ ERHEBUNG*

*DER KOLONISIERUNG MIT PILZEN "*

**STUDIENZENTRUM / STUDIENLEITER:**

BITTE VERVOLLSTÄNDIGEN						BITTE ZUTREFFENDES ANKREUZEN											
PATIENTEN-NR.	GESCHLECHT (M / W)	GEBURTS- GEWICHT [G]	GEST.-ALTER (WOCHEN)	GEBURTS- DATUM	VAGINAL (V) / SECTIO. (S)	REKTAL- ABSTRICH ?	RACHEN- ABSTRICH ?	TRACHEAL- SEKRET ?	INTUBIERT ?	GEFÄSS- KATHETER ?	ANTIBIOTIKA ?	ANTIMYKOTIKA ? *	PARENT. ERNÄHRUNG ?	ABDOMINAL- CHIRURGIE (≤7	KORTIKO- STEROIDE ? *	KATECHOLA- MINE ?	ZUST. NACH INVASI. PILZ-, Z.N. ANTIMYK. THERAPIE ? *

\* FALLS ZUTREFFEND, BITTE SUBSTANZ / DOSIS / VERABREICHUNGSART / START - UND STOPP DATUM UND INDIKATION AUF RÜCKSEITE ANGEBEN

\*\* FALLS ZUTREFFEND, BITTE ERREGER UND INFEKTIONSLOKALISATION(EN) UND VERLAUF AUF DER RÜCKSEITE VERMERKEN.

**DIESES FORMBLATT GEHT IM ORIGINAL MIT DEN PROBEN AN DIE ZENTRALE STUDIENLEITUNG.**

**FORMBLATT 3 (FOLLOW-UP)**

***" MULTIZENTRISCHE PUNKT-PRÄVALENZ ERHEBUNG  
DER KOLONISIERUNG MIT PILZEN "***

**STUDIENZENTRUM / STUDIENLEITER:**

<b>Patienten-Nummer:</b>	<b>Verstorben (ja / nein; ggf. Datum)</b>	<b>Entlassen (ja / nein; ggf. Datum)</b>	<b>Noch hospitalisiert (ja / nein)</b>	<b>Invas. Pilzinfektion? * (ja / nein)</b>

**\* Bitte vervollständigen Sie bei vermuteter/dokumentierter invasiver Pilzinfektion auch Formblatt 4!**

**DIESES FORMBLATT GEHT IM ORIGINAL GGF. MIT FORMBLATT 4 UND DEN PILZISOLATEN VON PATIENTEN MIT INVASIVEN PILZINFEKTIONEN AN DIE STUDIENZENTRALE.**



## **FORMBLATT 4**

**" MULTIZENTRISCHE PUNKT-PRÄVALENZ  
ERHEBUNG DER KOLONISIERUNG MIT PILZEN „  
DOKUMENTATIONSBOGEN FÜR PATIENTEN MIT NACHGEWIESENER INVASIVER  
PILZINFEKTION WÄHREND DES FOLLOW-UP NACH PROBENENTNAHME**

- **Patienten-Nummer:**

- **Isolierte Pilz-Spezies:**

- **Positive Blutkultur? (bitte kreisen Sie Zutreffendes ein)**

*Ja    Nein*

*Falls ja, vervollständige die Tabelle*

Abnahme-Datum	Ergebnis	Herkunft (Katheter vs. peripher)

- **Urinkultur abgenommen? (bitte kreisen Sie Zutreffendes ein)**

*Ja    Nein*

*Falls ja, vervollständige die Tabelle*

Abnahme-Datum	Ergebnis	Herkunft (Beutel, Katheter, Punktion)

- **Liquor punktiert? (bitte kreisen Sie Zutreffendes ein)**

*Ja    Nein*

*Falls ja, komplettiere Tabelle*

	Datum	Datum
Leukozyten		
Erythrozyten		
Glucose		
Eiweiss		
Gram-Färbung		
Kultur		

- **Andere Kulturen?** (bitte kreisen Sie Zutreffendes ein)  
Falls ja, komplettiere Tabelle

*Ja    Nein*

Abnahme-Datum	Ergebnis	Herkunft (Abszess, Hautbiopsie etc.)

- **Andere Untersuchungen zur Evaluierung der Erkrankungsausbreitung**  
(bitte markieren Sie Zutreffendes mit einem Kreuz):

Untersuchung	Nicht durchgeführt	Normal	Pathologisch
Echokardiographie			
Ultraschall Schädel			
Funduskopie			
Ultraschall Abdomen/Niere			
Andere (erläutere)			

Bitte benutzen Sie Rückseite oder neues Blatt für notwendige Einzelheiten.

- **Durchgeführte Behandlung:**  
(bitte kreisen Sie alle zutreffenden Substanzen ein; bitte notieren Sie auch max. Tagesdosis, Start- und Stoppdatum der Behandlung!)

Substanz	Start-Datum	Stopp-Datum	max. Dosis [mg/kg/Tag]
keine Therapie			
Konvent. Ampho B			
Liposom. Ampho B			
Fluconazol			
Flucytosin			
Andere			

Bitte benutzen Sie Rückseite oder neues Blatt für notwendige Einzelheiten.

**Zentrale Studienleitung:**

**Dr.med. Frank-Michael C. Müller**

**Universitäts-Kinderklinik, Julius Maximilians-Universität Würzburg**

**Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg**

**Tel.: 0931-201-3409/3728 / Fax: 0931-201-3720**

**E-mail: fmmueller@mail.uni-wuerzburg.de**

Informationsformblatt über die mikrobiologische Untersuchung der Proben:

**Bundesweite Studie „Kolonisierung mit Pilzen bei intensivmedizinisch behandelten Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht  $\leq 1500\text{g}$  und einem Lebensalter  $\leq 28$  Tage“**

**Mikrobiologischer Befundbogen/ Abstrich vom:** \_\_\_\_\_

Ansprechpartner der Klinik

Klinikadresse

Telefon-/Faxnummer

***Dr. med. Frank-Michael C. Müller***

Molekularbiologisches Labor

Telefon: 0931 – 201-3409/3728

Telefax: 0931 – 201-3720

E-mail: fmmueller@mail.uni-

wuerzburg.de

**Datum :**

**Klinik:** \_\_\_\_\_

Patientennummer:	Studiennummer A:		Abstrichort: Anal Rachen Trachea
	Speziesidentifikation:		
	Studiennummer B:		Abstrichort: Anal Rachen Trachea
	Speziesidentifikation:		

Prof. Dr. M. Frosch  
Direktor Inst. f. Hygiene u. Mikrobiologie

Dr. med. F.-M.Müller  
Doktorandin Fr. Pamela Meyer  
Studienleitung

# Lebenslauf

## L E B E N S L A U F

### PERSONALIEN:

Vor- und Zuname: Pamela Meyer  
Geburtstag: 09.02.1978  
Geburtsort: Dettelbach  
Eltern: Peter Meyer  
Brigitte Siebenlist  
Geschwister: Dr. Eileen Meyer  
Wohnort: 97337 Dettelbach, Albrecht-Dürer-Str. 59  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Konfession: römisch-katholisch

### SCHULBILDUNG:

1984 – 1988 Rudolf - von - Scherenberg - Grundschule  
Dettelbach  
1988 - 1997 Egbert - Gymnasium der Benediktiner-  
abtei Münsterschwarzach  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### STUDIUM:

1998 - 2004 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen  
Julius - Maximilians - Universität Würzburg  
Mai 2004: Abschluss: 3. Staatsexamen



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 2001 bis November 04 in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. F. M. Müller an der Kinderklinik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Die mikrobiologische Differenzierungen wurden am Institut für Hygiene und Mikrobiologie unter Leitung von Frau PD Dr. M. Abele-Horn und Herrn Prof. Dr. M. Frosch durchgeführt, die molekularbiologischen Untersuchungen wurden im Institut für Infektionsbiologie ausgeführt.

Meinen persönlichen Dank möchte ich Herrn PD Dr. med. F. M. Müller für die Überlassung dieses Themas und die wertvolle Unterstützung und Betreuung bei der Ausarbeitung aussprechen. Für die vielen Anregungen bei der Anfertigung von Diagrammen und Auswertungen, und die ständige Motivation zum rechtzeitigen Beginn der schriftlichen Verfassung der Arbeit, bin ich ihm sehr dankbar.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei Frau Andrea Staudigel, medizinisch-technische Assistentin, der ich die zahlreichen Kenntnisse über die konventionellen Techniken zur Identifizierung von *Candida*-Spezies zu verdanken habe. Durch ihre ständige Bereitschaft zur Klärung auftretender Fragen in der experimentellen Phase dieser Arbeit, gelang es mir auf schnellem Wege reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Ohne ihren Rat, ihre Kritik und Geduld wäre die Fertigstellung nicht in dieser Zeit zu bewältigen gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Cornelia Heeg und Birgit Hofmann, medizinisch technische Assistentinnen des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie, für die unkomplizierte und ausdauernde Hilfe bei der Auswertung der riesigen Probenanzahl bedanken. Ihr Rat und ihre fachliche Kompetenz waren unglaublich.

Für die Unterstützung bei der Anfertigung der Datenbank, besonderen Fragestellungen bei Datenauswertungen und allen computertechnischen Problemsituationen möchte ich mich auf das herzlichste bei Herrn Raymond Polyak, Systemadministrator, bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei allen Studienteilnehmern für die zahlreiche Resonanz, die gewissenhafte Ausführung in den Fragebögen und die unkomplizierte Übersendung von

Probenmaterial bedanken. Ohne Ihre zahlreiche Teilnahme wäre eine Studie in diesem Umfang nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank an:

(alle Ansprechpartner und Klinikname sortiert nach alphabetischer Reihenfolge des Orts)

CÄ Dr. med. U. Zippel, (Kreis Krankenhaus, Kinderklinik, Altenburg), Dr. B. Hoch (Josefinum Kinder Krankenhaus, Pädiatrie, Augsburg), Dr. Carsten Friedrich (Kreis Krankenhaus, Kinderabteilung, Bad Hersfeld), Dr. med. Robert Miething, Dr. med. Hammond (Kreuznacher Diakonie, Kinderfachabteilung, Bad Kreuznach), Dr. med. Meinhard Schatz (Klinikum Bamberg, Kinderklinik, Bamberg), Prof. Dr. med. Gerhard F. Wündisch (Klinikum Bayreuth, Kinderklinik, Bayreuth), Dr. med. Andreas Höck, (Klinikum Buch, 2. Kinderklinik K2, Berlin), Dr. med. Karl Schunck (Krankenhaus im Friedrichshain, Abteilung Kinderheilkunde, Berlin), OÄ Dr. B. Schmidt (DRK-Kliniken Westend, Pädiatrische Intensivstation, Berlin), OA Dr. Hannes Hammer (Charité Universitätsklinikum der Humboldt Univ., Campus Mitte/ Neonatologie, Berlin), OA Dr. med. A. Widera, Dr. Sielisch (St.-Joseph-Krankenhaus, Kinderklinik, Berlin), OÄ Dr. med. Bösing, OÄ Dr. med. Heinzl (Kinderzentrum Gilead, Kinderklinik, Bielefeld), Dr. med. N. Teig (St-Josef-Hospital, Abteilung Neonatologie, Bochum), Dr. Werner Garbe (St.-Marien-Hospital, Abteilung Neonatologie, Bonn), Prof. Dr. Dr. med. Peter Bartmann (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Perinatalzentrum, Bonn-Venusberg), Dr. med. H. Vahldieck (Städt. Klinikum, Abteilung Neonatologie, Brandenburg), Dr. med. Herbert Boenisch (Städt. Krankenhaus Holwedestraße, Kinderklinik, Braunschweig), Dr. med. Albrecht, H. Schwalm (Zentralkrankenhaus St.-Jürgen-Straße, Pädiatr. Intensivmedizin, Bremen), Prof. Huppertz (Zentralkrankenhaus St.-Jürgen-Straße, Prof.-Hess-Kinderklinik, Bremen), CA Dr. med. J. Schulz-Baldes (Kinderklinik "DRK-Krankenanstalten Wesermünde", Bremerhaven), OA Dr. Gunnar Grüning (Kinderklinik AKH, Neonatologische IST K2, Celle), CA Dr. med. Ulrich Schamberger, Dr. Hofmann (Klinikum Coburg, Klinik für Kinder- u. Jugendliche, Coburg), OA Dr. med. G.-P. Frey, (Perinatalzentrum, Darmstadt), OA Dr. W. Pielemeier, Dr. Becker (Vestische Kinderklinik, Abteilung Neonatologie, Datteln), OA Dr. med. Welsch (Klinikum Deggendorf, Kinderklinik, Deggendorf), OÄ Dr. med. Margot Reuter (Städt. Klinikum, Kinderklinik, Dessau), CA Dr. med. G. Kluitmann (St.-Vincenz-Hospital, Kinderklinik, Dinslaken), OA Dr. Hofmann (Kathol. Klinikum St.-Johannes-Hospital, Kinderklinik, Duisburg), OA Dr. med. Andreas Rech (Städt. Klinikum, Perinatalzentrum, Duisburg), Dr. Dombrowski (Diakoniewerk Kaiserswerth, Kinderklinik, Düsseldorf), Prof. Dr. med. H. Schroten (Heinrich-Heine-Universität, Kinderklinik, Düsseldorf), CA Dr. med. J.M. Kasper (Wartburg Klinikum, Klinik für Kinder- u. Jugendmedizin, Eisenach), Dr. med. H.-J. Bittrich

(Klinikum Erfurt, Klinik für Kinder- u. Jugendmedizin, Erfurt), PD Dr. med. M. Ries, Dr. Lugauer (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Universitäts-Kinderklinik, Erlangen), L. Hammer, PD Dr. L. Hanssler (Universitätskinderklinik Essen, Allg. Pädiatrie, Essen), OA Dr. med. Niethammer (Städt. Kliniken, Klinik für Kinder u. Jugendliche, Esslingen), Dr. med. Rolf Schlösser (Klinikum der Joh.-Wolfg.-von-Goethe-Universität, ZKJ der Universitätskinderklinik, Frankfurt a. Main), OA Dr. H. Köppen, Dr. Scholz, Dr. med. Dietmar Krämer (Städt. Kliniken Ffm-Höchst, Kinderklinik / Station B 30, Frankfurt Höchst), Dr. med. R. Zaum (St. Josefs-Krankenhaus, Fachabteilung für Kinderheilkunde, Freiburg), OA Dr. Hentschel (Albert-Ludwigs-Universität, Universitäts-Kinderklinik, Freiburg), Dr. S. Jedwilayties (Städt. Krankenhaus, Kinderklinik, Friedrichshafen), Dr. Weber (Städt. Kliniken, Abteilung für Kinder- u. Jugendmedizin, Fulda), OA Dr. Steigenberger, Dr. Ulrike Walther (Kinderklinik, Station K 7, Fürth), OA Dr. A. Suchowsky, Dr. M. Drauf (Städt. Kinderklinik, Abteilung Neonatologie, Gelsenkirchen), OA Dr. Göbe (Marien-Hospital, Kinderklinik, Gelsenkirchen), OA Dr. Matthias Heckmann (Zentrum Kinderheilkunde der Justus-v.-Liebig- Univ., Abteilung Neonatologie, Gießen), OÄ Dr. med. E. Beyersdorff (Ernst-Moritz-Arndt-Universitäts-Kinderklinik, Abteilung Neonatologie, Greifswald), OA Dr. W. Schäfer (Allg. Krankenhaus, Kinderklinik, Hagen), OA Dr. med Frank Nagel, Prof. Dr. med. U. Sitka (Martin-Luther-Universität, Kinderintensiv. Station 6, Halle-Wittenberg), Dr. Axel Hennenberger (Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg), Dr. von der Wense (Altonaer Kinderkrankenhaus - Perinatalzentrum, Neugeborenenintensivstation, Hamburg), Dr. med. Michael Dördelmann (Kliniken der Medizinischen Hochschule, Päd. Pneumologie u. Neonatologie/ Station 69, Hannover), PD Dr. rer. Nat. Evelyn Kattner (Kinderkrankenhaus auf der Bult, Neonatologie, Hannover), Dr. med. Reinhard Jensen (Westküstenklinikum, Kinderklinik, Heide), OÄ Dr. J. Bauer, Dr. P. Rued, Prof. Dr. med. O. Linderkamp (Kinderklinik der Ruprecht-Karls-Universität, Abteilung Neonatologie, Heidelberg), Dr. med. Rolf Muchow, (Klinikum Kreis Herford, Kinderklinik / Neonatologie, Herford), Dr. med. Hans Ulrich Peltner (St. Bernward Krankenhaus, Neonatologie, Hildesheim), Martin Endres, CA Dr. J. Kerstan (Städt. Krankenhaus, Kinderklinik / Neonatologie, Hildesheim), Dr. med. Löffler (Universität des Saarlandes, Universitätskinderklinik, Homburg / Saar), CA Prof. med. Helmut Paus (Krankenhaus Itzehoe, Kinderabteilung, Itzehoe), OÄ Dr. med. U. Remmler, Dr. Diel (Westpfalz Klinikum, Kinderklinik, Kaiserslautern), OA Dr. M. Much, OA Dr. U. Seitz (Klinikum der Stadt Karlsruhe, Kinderklinik, Karlsruhe), CA Prof. Dr. med. Helmut Wehinger (Klinikum Kassel, Kinderklinik, Kassel), CA Dr. med. Christoph Leonhardt (Klinikum Kaufbeuren, Kinderabteilung, Kaufbeuren), Dr. med. Jörg Franke (Klinikum Kempten-Oberallgäu, Neonatologie, Kempten), PD Dr. W. Nikischin (Klinikum an der Christian-

Albrechts-Universität, Abteilung Neonatologie, Kiel), Dr. med. Niemeyer (St.-Antonius-Hospital, Kinderklinik, Kleve), PD Dr. med. Michael Weiss, Angela Kribs (Krankenanstalten der Stadt Köln, Pädiatrische Klinik, Köln), Prof. Roth, Dr. A. Martin (Klinikum der Universität zu Köln, Abt. Allgemeine Pädiatrie, Köln), OA Dr. Peter Heister (Klinikum Krefeld, Kinderklinik/ Imschweiler K 5, Krefeld), CA Dr. med. Jürgen Bensch, Dr. med. Blank (Vinzentius-Krankenhaus, Kinderklinik, Landau), CA Dr. med. Klaus Hofweber (Kinderkrankenhaus St. Marien, Abteilung Neonatologie, Landshut), Dr. Holger Möbius, Dr. M. Finke (Kreiskrankenhaus, Kinderabteilung, Leer), Mathias Knüpfer (Universitätsklinikum Leipzig, Kinderklinik, Leipzig), OA Dr. med. H. Ebbecke (St.-Bonifatius-Hospital, Kinderabteilung, Lingen/ Ems), Dr. med. Thomas Hofmann (Ev. Krankenhaus, Kinderklinik, Lippstadt), Dr. med. P. Ahrens (Med. Universität Lübeck, Klinik für Neonatologie, Lübeck), Dr. med. Peter Krieg (St.-Anna-Stift, Kinderklinik, Ludwigshafen), OA Dr. Hubertus Schultz (Städt. Klinikum Magdeburg, Magdeburg), Dr. W. Krämer, Prof. Dr. med. Fred Zepp (Klinikum der Johannes-Gutenberg-Universität, Kinderklinik, Mainz), Dr. med. A. Leonhardt (Zentrum für Kinderheilkunde der Philipps-Univ., Allgemeine Kinderheilkunde, Marburg), OA Dr. med. Ralf Pallacks (Klinikum Memmingen, Perinatalzentrum, Memmingen), CA Dr. med. Axel Schobeß (Carl-v.-Basedow-Klinikum, Klinik für Pädiatrie, Merseburg), OÄ Dr. med. Stefanie Eisberg (Klinikum Minden 2, Kinderklinik, Minden), Dr. Renate Bredahl (Krankenhaus Bethanien, Kinderklinik/ Station 3F, Moers), OÄ Dr. med. U. Schriever (Krankenhaus Neuwerk, Kinderklinik, Mönchengladbach), OA Dr. med. Jürgen Wintgens (Elisabeth-Krankenhaus Rheydt, Kinderklinik, Mönchengladbach), Caroline v. Ehrenstein, Dr. Genzel (Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilian-Univ., Neonatologie, München), Prof. Lipowsky, Tina Siegert, Dr. U. Wintergerst, Dr. Georg Münch (Dr.-v.-Hauersches-Kinderspital, Neonatologie, München), CA Prof. Dr. med. Reinhard Roos (Städt. Krankenhaus, Kinderabteilung, München-Harlaching), CA Dr. med. Juoh. Uekötter (Clemens-Hospital, Kinderabteilung, Münster), Dr. Isabell Hörnig -Franz (Wilhelms-Universität, Kinderklinik, Münster), Dr. Florian Wild (Kliniken "St. Elisabeth", Klinik für Kinderheilkunde, Neuburg), OÄ Dr. med. E.-M. Thuresson, CÄ PD Dr. med. Christiane Seitz (Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Kinderklinik, Neumünster), Dr. med. Elke Jung (Kinderklinik-Kohlhof, Neunkirchen), Prof. Dr. med. P.G. Köhl (Städt. Kliniken, Kinderklinik, Neuss), OÄ Dr. Meyer, Dr. Eschmann (St.-Elisabeth-Krankenhaus, Klinik für Kinder- u. Jugendmedizin, Neuwied), Dr. med. Elke Jacobs, (Ev. Krankenhaus Oberhausen, Kinderintensivstation F6b, Oberhausen), Dr. med. Jürgen Hautz (Klinikum Offenburg, Kinderklinik, Offenburg), Prof. Dr. med. J. Seidenberg (Elisabeth Kinderkrankenhaus, Abteilung Neonatologie, Oldenburg), Prof. Seidenberg, OÄ Dr. Cloppenburg (Städt. Kliniken, Neonat. Intensivst. 151, Oldenburg),



CA Dr. med. B. Rodeck (Marienhospital, Kinderabteilung/ Station D 4, Osnabrück), OA Dr. Nawracala, Dr. Klardt (Kinderhospital, Neonatologie, Osnabrück), Dr. med. P. Richter (Kinderklinik des St.-Vincenz-Krankenhauses, Paderborn), Dr. med. Erdmann (Marienkrankenhaus, Kinderabteilung, Papenburg), Dr. G. Handwerker (Kinderklinik Dritter Orden, Station 1, Passau), CA Dr. H.-L. Reiter, I. Pappas (Städt. Klinikum, Kinderklinik, Pforzheim), Dr. med. Hildegard Zeleni (Klinikum Ernst-v.-Bergmann, Abteilung Neonatologie, Potsdam), OA Dr. med. P. Schindler (Klinik St. Hedwig, Kinderklinik, Regensburg), Dr. med. Thomas Reese (Mathias-Spital, Kinderabteilung, Rheine), Dr. Sabine Bock (Klinikum Rosenheim, Klinik für Kinderheilkunde, Rosenheim), OÄ Dr. med. Marlies Uhlemann (Universität Rostock - Kinderklinik, Abt. Neonat. U. Päd. IST, Rostock), OÄ Barbara Gaida (Diakoniekrankenhaus, Kinderklinik/ Station 17, Rotenburg (Wümme)), Thomas Leinenbach (Stadtkrankenhaus Hessenklinik, Kinderklinik, Rüsselsheim), Dr. Volker Habermann (Saarbrücker Winterberg Kliniken, Kinderklinik / Station 55, Saarbrücken), Dr. med. Herbert Orth (St.-Elisabeth-Krankenhaus, Kinderklinik, Saarlouis), OA Dr. med. Michael Bohn (Städt. Krankenhaus Salzgitter-Lebenstedt, Kinderklinik, Salzgitter), OA Dr. Riedel (Margariten-Hospital, Kinderklinik, Schwäbisch Gmünd), OA Dipl.-med. K. Tober (Klinikum Uckermark, Abteilung Neonatologie, Schwedt / Oder), CA Dr. med. Heinrich Giesen (Leopoldina-Krankenhaus, Kinderklinik, Schweinfurt), Dr. Pawlowski, Dr. Gietzelt (Medizinisches Zentrum - Kinderklinik, Station A 6, Schwerin), Dr. Witzel, OÄ Dr. med. Brigitte Kodsí (DRK-Kinderklinik, Intensivmedizin. Abteilung, Siegen), OÄ Dr. med. Heike Schmidt (Hegau Klinikum, Kinderklinik, Singen), Albrecht Brückner (Krankenhaus der Ev. Diakonie-Anstalt, Kinderkrankenhaus, Speyer), Dr. Brangenberg (Kreiskliniken Traunstein-Trostberg, Abteilung Neonatologie, Traunstein), Leit. OA Dr. med. Rangmar Goelz, Prof. Dr. med. Dietrich Niethammer (Eberhard-Karls-Universität, Klinikum Schnarrenberg/ Kinderklinik, Tübingen), Dr. Reinhard Kaiser (Klinikum der Stadt Villingen-Schwenningen, Kinderklinik, Villingen-Schwenningen), OA Dr. M. Kratz (Kreiskrankenhaus, Kinderklinik, Waiblingen), OA Dr. Friedrich Straßer (Städt. Kinderklinik, Abteilung Neonatologie, Weiden), Arnd Jacobs (Marien-Hospital, Kinderklinik, Wesel), Dr. med. Änne Thiel (Dr.-Horst-Schmidt-Kliniken, Kinderklinik, Wiesbaden), CA Dr. med. Meyer (Reinhard-Nieter-Krankenhaus, Kinderklinik, Wilhelmshaven), CA Dr. med. Heldmann (Klinikum Wuppertal-Barmen, Kinderklinik, Wuppertal-Barmen), OA Dr. med. Johannes Wirbelauer (Julius-Maximilians-Universität, Universitäts-Kinderklinik/ Station Wolkennest, Würzburg).