

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

Echinocandin-Resistenzen in *Candida glabrata*

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Alexander Maximilian Aldejohann
aus Neuwarendorf

Würzburg, Juni 2022



Referent: Professor Dr. med. Oliver Kurzai

Koreferent: Professor Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2022

Der Promovend ist Arzt

für Johanna

Hermann und Anneliese

Theo und Renate

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | <i>Candida</i> Spezies als Pathogen Invasiver Mykosen | 1 |
| 1.1.1 | <i>Candida glabrata</i> (syn. <i>Nakaseomyces glabrata</i>) | 4 |
| 1.1.2 | <i>Candida glabrata</i> „Small Colony Variants“ (SCV) | 6 |
| 1.2 | Antimykotika und Resistenzen | 8 |
| 1.2.1 | Echinocandine | 8 |
| 1.2.2 | Azole | 11 |
| 1.2.3 | Aktuelle Resistenzentwicklung und Multidrug- Resistenzen | 13 |
| 1.3 | Resistenztestungen..... | 14 |
| 1.3.1 | Referenz-Methoden | 14 |
| 1.3.2 | Kommerzielle Methoden | 16 |
| 1.3.3 | Genotypisierung..... | 17 |
| 1.4 | Ziele der Arbeit..... | 18 |
| 2 | Material und Methoden | 19 |
| 2.1 | <i>C. glabrata</i> Stammsammlung des NRZMyk | 19 |
| 2.1.1 | Medien und <i>Candida</i> -Kulturen | 25 |
| 2.1.2 | DNA-Extraktion | 27 |
| 2.1.3 | PCR-Protokolle | 28 |
| 2.1.4 | Gelelektrophorese..... | 29 |
| 2.1.5 | DNA-Aufreinigung und Sequenzierung | 30 |
| 2.1.6 | Spezies-Identifizierung..... | 30 |
| 2.1.7 | <i>FKS</i> -Gensequenzierung | 31 |
| 2.1.8 | Referenzmikrodilution nach EUCAST | 32 |
| 2.1.9 | Micronaut-AM (Merlin Bruker)..... | 34 |
| 2.1.10 | Yeast-One (Fisher Scientific) | 37 |
| 2.1.11 | VITEK2 mit AFST-YS08 Resistenzkarte (bioMérieux) | 40 |
| 2.1.12 | Etest (bioMérieux)..... | 42 |
| 2.1.13 | Breakpoints nach EUCAST und CLSI | 43 |
| 2.1.14 | Qualitätskontrolle der Testverfahren | 43 |
| 2.1.15 | Labor-Ringversuch..... | 45 |
| 2.1.16 | Statistik | 45 |

| | | |
|-------|--|------|
| 2.2 | <i>C. glabrata</i> -SCV Screening | 46 |
| 3 | Ergebnisse | 47 |
| 3.1 | Auswertung klinischer <i>C. glabrata</i> Isolate (2015-2019)..... | 47 |
| 3.1.1 | Initiale Echinocandin-Resistenztestungen | 49 |
| 3.1.2 | <i>FKS</i> -Sequenzanalyse | 51 |
| 3.1.3 | Korrelation <i>FKS</i> -Mutation und Anidulafungin-MHK..... | 53 |
| 3.1.4 | Echinocandin-Empfindlichkeit bei AND^R/FKS^{wt} Stämmen..... | 56 |
| 3.1.5 | Auswertung Labor-Ringversuch..... | 59 |
| 3.1.6 | Fluconazol- und Multidrug-Resistenzen (MDR) | 62 |
| 3.2 | Häufigkeit von <i>C. glabrata</i> -SCV in Würzburg..... | 65 |
| 4 | Diskussion..... | 67 |
| 4.1 | Genotypische vs. phänotypische Echinocandin-Resistenztestung | 70 |
| 4.1.1 | Genotypische Resistenztestungen und Mutationsanalyse..... | 70 |
| 4.1.2 | Phänotypische Resistenztestungen und Borderline-Stämme | 74 |
| 4.2 | Ringversuch: AND^R/FKS^{wt} in <i>C. glabrata</i> , ein Paradigmenwechsel? . | 77 |
| 4.3 | SCV-Fluconazol- und MDR-Resistenzen | 80 |
| 4.4 | Schlussfolgerungen..... | 83 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 85 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 86 |
| | Appendix | i |
| | I. Abkürzungsverzeichnis | i |
| | II. Abbildungsverzeichnis | iv |
| | III. Tabellenverzeichnis | vi |
| | IV. Danksagung..... | viii |
| | V. Lebenslauf..... | x |
| | VI. Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme | xi |

1 Einleitung

1.1 *Candida* Spezies als Pathogen Invasiver Mykosen

Invasive Pilzkrankungen gewinnen im klinischen Alltag stetig an Bedeutung [1, 2]. In Frankreich werden beispielsweise 6 Fälle / 100.000 Einwohner / Jahr und eine Sterberate von fast 30 % mit invasiven Mykosen assoziiert, während für Deutschland zurzeit keine suffiziente Datenlage zu eruieren ist [2, 3]. Neben *Candida* Spezies sind als Verursacher hauptsächlich *Aspergillus*-, *Cryptococcus*- und seltener *Mucorales*- und *Fusarium* Spezies zu benennen [2-7]. Der Infektionsfokus ist ebenso divers wie das betroffene Patienten*innenspektrum. Es gelten u. a. immungeschwächte Patienten*innen wie Früh- und Neugeborene, Patienten*innen nach Organtransplantationen, HIV-Patienten*innen und Patienten*innen mit onkologischer Grunderkrankung als dauerhaft gefährdet [8-11]. Die Bandbreite der Manifestationen reicht von lebensbedrohlichen Blutstrominfektionen bis hin zu Organ- und Augeninfektionen [11-14]. Ferner werden als Faktoren für die Zunahme invasiver Pilzkrankungen u. a. der stetige medizinisch-technologische Fortschritt, ein immer älter werdendes Patienten*innenklientel und die Zunahme von Komorbiditäten diskutiert [15-17].

Auf Basis molekularbiologischer Analysen zu Verwandtschaftsverhältnissen (u. a. Multi-Locus-Sequenzierungen, Ganzgenomsequenzierungen) unterliegen einzelne Spezies innerhalb der historisch gewachsenen und phylogenetisch heterogenen Gattung *Candida* aktuell einer taxonomischen Reklassifizierung [18]. Diese Namensänderungen ordnen artverwandte Spezies wesentlich präziser einander zu; sind jedoch im klinischen Alltag noch wenig verbreitet und geläufig [18]. In dieser Arbeit werden die aktuell taxonomisch korrekten Spezies-Bezeichnungen den in der Klinik gebräuchlichen einmalig in Klammern nachgestellt. Der besseren Verständlichkeit halber im weiteren Verlauf jedoch die alte Nomenklatur beibehalten.

Invasive Mykosen durch *Candida* Spezies sind mehrheitlich auf sechs verschiedene, opportunistisch humanpathogene Arten zurückzuführen: *Candida albicans*, *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*), *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* (*Pichia kudriavzevii*) und eine neu entdeckte und weltweit im Rahmen nosokomialer Ausbrüche bekannte Spezies namens *Candida auris* [19-22]. Seltenerer Auslöser sind u. a. *C. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*), *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa* (*Wickerhamomyces anomalus*), *C. kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*), *C. lipolytica* (*Yarrowia lipolytica*), *C. famata* (*Debaryomyces hansenii*), *C. inconspicua* (*Pichia cactophila*), *C. rugosa* (*Diutina rugosa*) oder *C. norvegensis* (*Pichia norvegensis*) [18, 23].

Bei ca. 50-70 % aller gesunden Erwachsenen können Hefepilze als Teil der normalen Flora nachgewiesen werden. Zu einer Infektion kommt es u. a. durch Faktoren wie die Destruktion der Haut- / Schleimhautbarriere, Überkolonisation (z. B. nach Antibiotikatherapie), dem Vorhandensein chronischer Erkrankungen und einem geschwächten Immunstatus [19, 21]. Im Formenkreis invasiver *Candida*-Infektionen werden u. a. zwischen Candidämien und daraus eventuell resultierenden disseminiert akuten oder chronischen Candidosen unterschieden [23, 24]. So kommt es initial zu Blutstrominfektionen mit anschließender akuter Aussaat in andere Organsysteme. Bei neutropenen Patienten*innen kann diese Aussaat v. a. in Leber und Milz chronisch persistieren [23, 24]. Fulminant verlaufende Candidämien sind mit Mortalitätsraten von über 70 % assoziiert [19]. Bezogen auf Blutstrominfektionen werden *C. albicans* gefolgt von *C. glabrata* am häufigsten als auslösende Pathogene einer Candidämie in Europa beschrieben [25-28]. Die intensivmedizinische Inzidenz dieser Infektionen wird derzeit auf etwa 2,1 bis 6,7 pro 1000 Aufnahmen geschätzt, wobei weltweit Candidämien als vierthäufigste Ursache für Blutstrominfektionen gelten [26, 27]. Nach einer Surveillance-Studie von Schwab *et al.* wird die Gesamtmortalität von *Candida* Spezies auf deutschen Intensivstationen bei monomikrobiellen Blutstrominfektionen mit 25,2 % angegeben ($p < 0,001$) [29]. Ferner zeigt sich, dass insbesondere Non-*albicans* Spezies inklusive *C. glabrata* mit 27,1 % eine höhere Mortalität als *C. albicans* mit 24,6 % aufweisen. Dies könnte u. a. mit

einem zunehmenden Resistenzprofil bzgl. antimykotisch wirksamer Arzneimittel assoziiert sein [29]. Darüber hinaus tritt ein signifikanter Anteil von *Candida* Infektionen außerhalb von Intensivstationen auf. Aufgrund der unzureichenden Datenlage wird die Gesamtinzidenz invasiver Candidosen in Deutschland konservativ auf mindestens 2.000-12.000 Fälle pro Jahr geschätzt, welches weiterhin den Stellenwert dieser Infektion im klinischen Kontext unterstreicht [1].

1.1.1 *Candida glabrata* (syn. *Nakaseomyces glabrata*)

1917 wurde *Candida glabrata* erstmals aus Stuhlproben isoliert und dem Genus *Cryptococcus* zugeordnet [30]. Zu diesem Zeitpunkt galt die Hefe als apathogener Kommensale der Darmflora [31]. 21 Jahre später erfolgte durch Lodder und De Vries eine neue Klassifikation in filamentierende und nicht-filamentierende Arten, wobei *C. glabrata* aufgrund fehlender Ausprägung dieser Strukturen von dort an als *Torulopsis glabrata* bezeichnet wurde [32]. Im Jahre 1978 fand schließlich die Einordnung in den heterogenen Genus *Candida* statt [33]. 10 Jahre später (1988) gelang es diese Spezies erstmalig als Pathogen mucosaler und invasiver Candidosen zu identifizieren [34]. In der aktuellen auf molekularbiologischen Analysen basierten Taxonomie wird *C. glabrata* als *Nakaseomyces* (*N. glabrata*) reklassifiziert [35]. Eine Clade aus jeweils drei humanpathogenen und drei apathogenen Spezies, welche sich durch verwandtschaftliche Nähe zu *Saccharomyces* und *Kluyveromyces* auszeichnet [31, 36].

C. glabrata gilt derzeit als Auslöser für die Hälfte aller invasiven Candidosen durch Non-*albicans* Spezies und somit zweit häufigster Grund für Candidämien von immunsupprimierten Patienten*innen nach *C. albicans* [37, 38]. Im direkten Vergleich der beiden Spezies imponiert *C. glabrata* u. a. mit kleineren Hefezellen (1-4 µm), einem haploiden Genom und dem Fehlen bestimmter Virulenzfaktoren (wie z. B. der Sekretion von Proteinasen) [39-41]. Pathogenitätsfaktoren wie Adhäsine ermöglichen die Anhaftung beider Spezies an ihre Host-Zelle und sind essenziell für Kolonisation und Infektion [42]. Bezüglich *C. glabrata* sind hier Epa Proteine relevant, welche v. a. das Anhaften an Epithelzellen als auch Makrophagen ermöglichen und phylogenetisch mit den Flo Proteinen von *S. cerevisiae* verwandt sind [43, 44]. Während *C. albicans* u. a. durch induzierte Endozytose oder die aktive Bildung von Pseudohyphen unter Zelldestruktion bei reaktiver Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Aktivierung des Immunsystems in tiefere Gewebeschichten eindringt, ist die Invasion von *C. glabrata* noch nicht in Gänze verstanden [45]. Eine Möglichkeit tiefere

Gewebeschichten zu erreichen und somit Anschluss an das Blutsystem zu erlangen, liegt in dem Nutzen einer vorbestehenden Gewebedestruktion (z. B. durch Trauma, Katheter-Anlage oder chirurgische Intervention) [46]. Im Tiermodell konnte jedoch eine hämatogene Aussaat bei intaktem Epithelgewebe beobachtet werden, sodass aktuell ebenfalls Endozytose als weitere Möglichkeit zwecks Invasion diskutiert wird [47, 48]. Ein bemerkenswerter Virulenzfaktor ist das Überleben von *C. glabrata* in Makrophagen [49]. Die Hefe entzieht sich der Phagozytose durch Modifikation des Lysosoms und vermehrt sich in diesen bis zum Aufplatzen der Immunzellen [49, 50].

Das klinische Erscheinungsbild reicht von oberflächlichen mucosalen Infektionen (zumeist den Oropharynx, den Oesophagus oder die Vagina betreffend) bis hin zu invasiven, schweren und lebensbedrohlichen Blutstrominfektionen mit ggf. Absiedelung in andere Organsysteme [19, 31]. Letzteres wird häufig durch ein supprimiertes Immunsystem u. a. in Folge von Malignomen, immunmodulierender Therapien oder anderen Infektionen, begünstigt [19, 22]. Zunehmende Resistenzen gegenüber diversen Antimykotika-Klassen limitieren zudem verfügbare therapeutische Optionen [51-54].

1.1.2 *Candida glabrata* „Small Colony Variants“ (SCV)

C. glabrata ist wie *Saccharomyces cerevisiae* befähigt zur Ausbildung sogenannter „petite“- oder „Small Colony Variants“(SCV)-Phänotypen, welche durch den Verlust der mitochondrialen Funktion, einem verkleinerten und langsamen Wachstum sowie der Hochregulation bestimmter Transkriptionsfaktoren charakterisiert sind [55]. Ursächlich hierfür ist eine fehlende Replikation mitochondrialer DNA (mtDNA), welche wesentliche Teile der Atmungskette kodiert. Eine Induktion dieser Hemmung oder ein vollständiger Funktionsverlust der entsprechenden mtDNA-Polymerase ist *in vitro* durch Inkubation mit Azolen, durch die Zugabe von Ethidiumbromid (Zerstörung der mtDNA) und durch Mutationen im *CgMIP1*-Gen beschrieben [56, 57]. Nicht alle Auswirkungen des Funktionsverlustes sind zwingend mit potenziellen Fitness-Einbußen verbunden. So führen u. a. hochregulierte Transkriptionsfaktoren zur Ausbildung von Effluxpumpen, welche wiederum zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Azol-Antimykotika beitragen können [55]. Auf welche Weise Azole jedoch SCV-Phänotypen triggern, ist bislang unbekannt [58].

Klinische *C. glabrata* Isolate mit petite-Phänotyp sind in der Fachliteratur wenig beschrieben [57]. Ihre Epidemiologie, klinische Relevanz und Resistenzprofile sind unklar [58]. Weitere potenzieller Trigger zur Induktion von petite-Phänotypen *in vivo* sind nicht erforscht. Allenfalls im Tiermodell wurde beobachtet, dass SCV-Phänotypen klinischer Isolate eine höhere, mit Ethidiumbromid *in vitro* induzierte Isolate jedoch eine niedrige Virulenz aufzuweisen scheinen [59].



Abb.1: Mikroskopische Aufnahme der Hefe *C. glabrata*. Zu sehen sind Mutter- und Tochterzelle bei 100-facher Vergrößerung.

1.2 Antimykotika und Resistenzen

1.2.1 Echinocandine

Die Wirkstoffklasse der Echinocandine umfasst die therapeutisch wirksamen Substanzen Anidulafungin, Caspofungin und Micafungin [60]. Die Identifikation des chemischen Hauptbestandteils von Anidulafungin wurde 1974 erstbeschrieben [61]. Im Jahr 1989 folgte die Entdeckung der Vorgängersubstanz von Caspofungin [62] und ein Jahr später schließlich die von Micafungin [63]. Anfang der 2000er Jahre wurde die Zulassung als Medikament sowohl in Europa als auch den USA erteilt (Abb.2) [1, 64, 65]. Echinocandine hemmen die β -1,3-D-Glucan-Synthetase humanpathogener Pilze und zielen somit auf ein essenzielles Element der Pilzzellwand: Das β -1,3-D-Glucan (Abb.3) [66]. Die Konsequenz ist eine für den Hefepilz letale Ruptur derselben [67, 68].

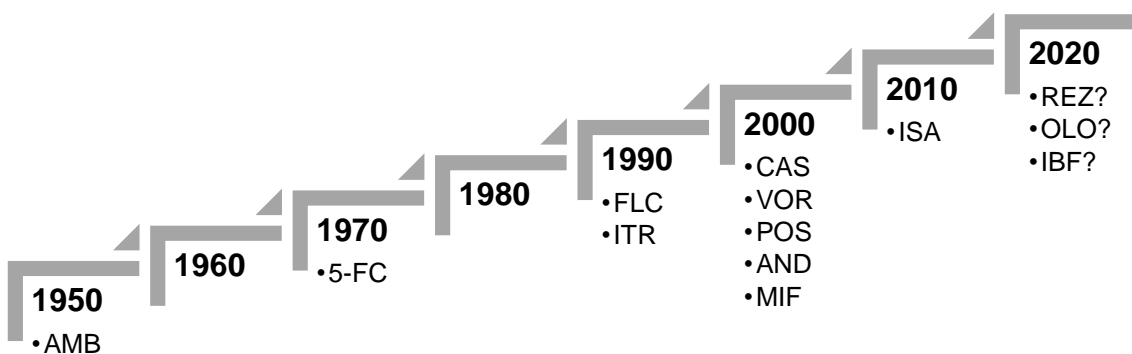


Abb.2: Die Markteinführung neuer Antimykotika zur Behandlung invasiver Pilzinfektionen in den Jahrzehnten 1950-2020. Abkürzungen: 5-Fluorocytosin (5-FC) Anidulafungin (AND); Amphotericin B (AMB); Caspofungin (CAS); Fluconazol (FLC); Ibrexafungerp (IBF); Isavuconazol (ISA); Itraconazol (ITR) Micafungin (MIF); Olorofim (OLO); Posaconazol (POS); Rezafungerp (REZ); Voriconazol (VOR). Abbildung modifiziert nach von Lilienfeld-Toal *et al.* [1].

Mehrere klinische Studien wiesen auf eine Nicht-Unterlegenheit im Vergleich zu den etablierten Antimykotika Amphotericin B und Fluconazol in Bezug auf mucosale und invasive *Candida*-Infektionen hin [69-72]. Einige Analysen deuteten eine Überlegenheit an [73-75]. Zudem zeigten sich ein günstigeres Nebenwirkungs- und Resistenzprofil im Vergleich zu Polyenen und Azolen [60, 76-80]. Aus diesen Gründen werden Echinocandine in den meisten Leitlinien als Erstlinientherapie, insbesondere bei kritisch kranken Patienten*innen, empfohlen [8, 9, 81-83]. Aktuell sind neue Echinocandine wie Rezafungin aber auch andere Substanzklassen (Olorofim, Ibrexafungin) Gegenstand klinischer Studien, um das Portfolio antimykotisch wirksamer Substanzen zu erweitern [84-86]

Mit zunehmendem Gebrauch von Echinocandinen wurde das Auftreten von Echinocandin-Resistenzen erstmalig im Jahr 2005 beobachtet [87]. Ein Jahr später gelang der Nachweis auch im Zusammenhang mit klinischen Isolaten von *C. glabrata* und *C. albicans* [88]. Echinocandin-Resistenzen werden in der Fachliteratur hauptsächlich mit Mutationen innerhalb von besonderen Hot-Spot-Abschnitten (HS) des *FKS*-Gens assoziiert, welche für die Kodierung des aktiven Zentrums (Transmembran-Domäne TM6 / TM7) der Synthetase verantwortlich sind (Abb.3). Punktmutationen innerhalb dieser HS führen zu Konformationsänderungen der katalytischen Untereinheiten der β -1,3-D-Glucan-Synthetase, sodass letztlich eine erhebliche Verringerung der Echinocandin-Affinität zum Zielenzym einen Funktionsverlust des Antimykotikums bedingt [52, 67, 88-91]. Im Gegensatz zu *C. albicans* besitzt *C. glabrata* zwei, funktionell als redundant geltende, *FKS*-Gene: *FKS1* und *FKS2*. Demnach können *in toto* vier potenzielle Abschnitte von Punktmutationen affiziert werden: *FKS1*-HS1, *FKS1*-HS2, *FKS2*-HS1 und *FKS2*-HS2 (Tab.1) [92, 93]. Echinocandin-resistente Phänotypen ohne *FKS* Mutation sind äußerst selten beschrieben, zumeist im Labor induziert und üben keinerlei bekannten Einfluss auf klinische Isolate aus [94, 95]. Ferner werden in der Fachliteratur Kreuzresistenzen innerhalb der Substanzklasse beschrieben. Dies bedeutet, dass bei Resistenz eines Echinocandins die zwei anderen ebenfalls (z.B. in dem jeweilig durchgeführten Testverfahren) eine vollständige Kreuzresistenz aufweisen [51].

Insbesondere in Bezug auf *C. glabrata* tragen die Plastizität des haploiden Genoms sowie Veränderungen innerhalb des DNA-Mismatch-Reparatursystems vermutlich zu einer Resistenzentwicklung unter Echinocandin-Therapie bei [51, 96]. Diese Aspekte führen zu einer Zunahme von Echinocandin-Resistenzen, induzieren Therapieversagen und limitieren die Auswahl etwaiger Therapieoptionen [51].

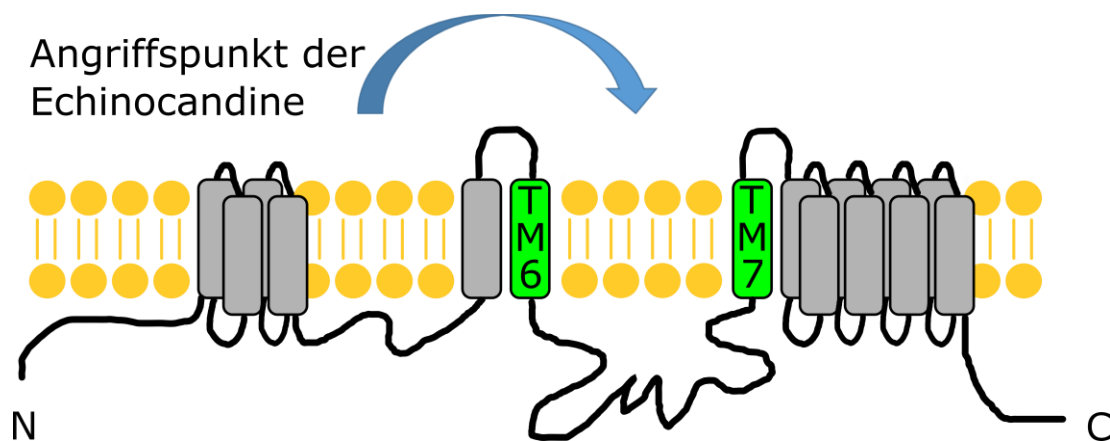


Abb.3: Schematische Darstellung der β -1,3-D-Glucan-Synthetase innerhalb der fungalen Zellmembran. Die Transmembrandomänen (grün) werden kodiert von HS1 (TM6) bzw. HS2 (TM7) des jeweiligen *FKS*-Gens (Tab.1). Abbildung vereinfacht und modifiziert nach Perlin *et al.* [90].

Tab.1: Wildtyp-Aminosäuresequenzen der Transmembrandomänen (TM6 und TM7) der β -1,3-D-Glucan-Synthetase. Diese Domänen stellen den Angriffspunkt für Echinocandine dar und werden von den jeweiligen Hot Spots (HS) beider *FKS*-Gene kodiert. Tiefgestellte Zahlen beschreiben die Positionen innerhalb des Proteins. Aminosäuren: Arginin (Arg); Asparaginsäure (Asp); Isoleucin (Ile); Leucin (Leu); Phenylalanin (Phe); Prolin (Pro); Serin (Ser); Threonin (Thr); Tyrosin (Tyr); Valin (Val).

| | | |
|-------------|------------|--|
| Fks1 | HS1 | Phe ₆₂₅ -Leu ₆₂₆ -Ile ₆₂₇ -Leu ₆₂₈ -Ser ₆₂₉ -Leu ₆₃₀ -Arg ₆₃₁ -Asp ₆₃₂ -Pro ₆₃₃ |
| | HS2 | Asp ₁₃₄₀ -Trp ₁₃₄₁ -Val ₁₃₄₂ -Arg ₁₃₄₃ -Arg ₁₃₄₄ -Tyr ₁₃₄₅ -Thr ₁₃₄₆ -Leu ₁₃₄₇ |
| Fks2 | HS1 | Phe ₆₅₉ -Leu ₆₆₀ -Ile ₆₆₁ -Leu ₆₆₂ -Ser ₆₆₃ -Leu ₆₆₄ -Arg ₆₆₅ -Asp ₆₆₆ -Pro ₆₆₇ |
| | HS2 | Asp ₁₃₇₄ -Trp ₁₃₇₅ -Val ₁₃₇₆ -Arg ₁₃₇₇ -Arg ₁₃₇₈ -Tyr ₁₃₇₉ -Thr ₁₃₈₀ -Leu ₁₃₈₁ |

1.2.2 Azole

Eine weitere Klasse relevanter Antimykotika sind die Azole. Vor allem die sowohl oral als auch parenteral applizierbaren Triazole (Fluconazol, Voriconazol), welche fungistatisch auf *Candida* wirken (Abb.2), werden im klinischen Alltag regelmäßig eingesetzt [40]. *C. glabrata* weist bereits intrinsisch eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber dieser Substanzklasse (vor allem Fluconazol) auf [97]. Zudem treten hochresistente Stämme auf [98]. Diverse Mechanismen tragen hierzu bei: Allen voran ermöglichen ca. 140 bekannte direkte Mutationen im *ERG11*-Gen mehr oder weniger relevante Konformationsänderung in der Cytochrom-P450 abhängigen C14-Demethylase, dem Angriffspunkt der Azol-Antimykotika [51]. Die *ERG*-Gen Familie spielt eine substanzielle Rolle in der Biosynthese von Ergosterol, welches, ähnlich dem humanen Cholesterol und neben dem erwähnten Glucan, ein weiteres zentrales Element der Zellmembran darstellt [68, 99, 100]. Diese Änderung in der Konformation führt zu einer Reduktion der Azol-Bindungsaffinität, sodass der Wirkmechanismus, über die Blockade des Enzyms sowohl die Gesamtmenge an Ergosterol zu reduzieren als auch eine alternative Enzymkaskade mit für den Pilz toxischen Intermediaten (Diolen) zu induzieren, vermindert oder in Gänze aufgehoben wird [40, 51]. Daneben werden sogenannte „Gain of Function“-Mutationen (GOF Mutationen) im - für die Transkription von *ERG11* zuständigen - *UPC2*-Gen diskutiert. Diese tragen via Überexpression zu einem „Überangebot“ des Enzyms und somit zu verminderter Azol-Empfindlichkeit bei [101]. Ein weiterer gängiger Mechanismus liegt in der Ausprägung von Effluxpumpen, welche intrazelluläre Azol-Konzentrationen durch kontinuierliches Ausleiten minimieren. Hauptvertreter dieser heterogenen Gruppe von ABC-Transportern (ATP-Binding Cassette) sind sowohl *CDR1*, *CDR2* als auch der *C. glabrata* spezifische Transporter *CgSNQ2*, die im wesentlichen Pan-Azol-Resistenzen induzieren [51, 102, 103]. Ferner wird ein zur „major facilitator super-family“ (MFS) gehörender Transporter namens *MDR1* im Zusammenhang mit Azol-Resistenzen assoziiert, welcher jedoch keine Auswirkungen auf Posaconazol, Itraconazol und Isavuconazol zu scheinen hat [103]. Ebenfalls kann hier eine GOF-Mutation über die Hochregulation der

entsprechenden Transkriptionsfaktoren (Tac2 für die Expression *CDR1* und *CDR2*; Mrr1 für die Expression von *MDR1*) eine Überexpression von Effluxpumpen bedingen und zu Azol-Resistenzen führen [51, 104]. Letztlich sei bemerkt, dass u. a. Heat-Shock-Proteine und die bereits erwähnten *C. glabrata*-SCV Auswirkungen auf die Azol-Empfindlichkeit zu haben scheinen [105, 106].

1.2.3 Aktuelle Resistenzentwicklung und Multidrug-Resistenzen

Die Entwicklung von resistenten oder multiresistenten Phänotypen (MDR) innerhalb der Gattung *Candida* erfolgt meist aufbauend auf bereits vorbestehende, intrinsisch verminderte Empfindlichkeiten gegenüber relevanten Substanzklassen [51]. So sind Spezies wie *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* oder aber *C. auris* häufig betroffen, währenddessen Multiresistenzen z. B. bei *C. albicans* keine signifikante Rolle zu spielen scheinen, da die Akquisition dieser mit Fitness-Einbußen für den Hefepilz assoziiert sind [107].

In den letzten Jahren konnte ein Anstieg von MDR-Phänotypen vor allem im Zusammenhang mit *C. glabrata* beobachtet werden [51]. So zeigen bereits ein wesentlicher Anteil klinischer *C. glabrata*-Isolate eine *bona fide* Resistenz gegenüber Fluconazol oder bilden diese unter Therapie aus [108-110]. Zudem schätzen aktuelle Studien die Inzidenz von *FKS*-mutierten *C. glabrata*-Stämmen auf 3-18 % [111-113].

Insbesondere bei *C. glabrata* können MDR-Resistenzen rasch unter Therapie entstehen und durch Defekte im Mismatch-Reparatursystem (Mismatch-Repair-Gen *MSH2*) begünstigt werden [51, 114]. Auch wird die Selektion resistenter Phänotypen in Biofilmen (Exposition subwirksamer Antimykotika-Konzentrationen durch ungenügende Penetration der extrazellulären Matrix) als begünstigender Faktor diskutiert [51].

1.3 Resistenztestungen

Die in 1.2 und besonders in 1.2.3 diskutierten Entwicklungen bedingen eine zunehmende Bedeutung von Resistenztestungen in der täglichen Labordiagnostik. Nur unter Nutzung phänotypischer als auch genotypischer Test-Methoden ist eine rechtzeitige Identifizierung relevanter Single- oder MDR-*Candida* Isolate möglich, kann Therapieversagen erkannt und für Patienten*innen irreversible schwere, möglicherweise sogar tödliche Verläufe abgewendet werden.

1.3.1 Referenz-Methoden

Phänotypische Referenzmethoden werden mittels Mikrobouillondilution (kurz Mikrodilution) nach Protokollen der europäischen Fachgesellschaft EUCAST (frei verfügbar unter: <https://www.eucast.org/astoffungi/>) oder der US-amerikanischen Gesellschaft CLSI durchgeführt [115-117]. Dieses hochstandardisierte und arbeitsintensive Verfahren besteht im Wesentlichen aus der Inkubation eines, mit der entsprechenden Erregermenge (Inokulum) sowie der spezifischen Konzentration des jeweiligen Antimykotikums versehenen, Flüssigkulturmediums [115-117]. Anhand mehrerer sich in der Konzentration jeweils duplizierender oder halbierender Ansätze (log₂-Verdünnungsstufe) ist es möglich, nach 24 h Bebrütung die sogenannte „Minimale Hemm-Konzentration“ MHK in mg/L visuell oder aber mit maschineller Hilfe abzulesen. Es gilt nun der Ansatz als MHK, bei welchem primär kein Wachstum des zu testenden Mikroorganismus mehr zu eruieren ist. Je nach Protokoll, Pathogen und Substanz können jedoch Abstufungen erfolgen. Bei der Testung von Echinocandinen und Azolen gilt beispielsweise für Hefen die MHK nach EUCAST, bei welcher ≥ 50 % Inhibition

des Wachstums im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Antimykotikum zu sehen ist (kurz: MHK50) [115]. Wesentliche Differenzen beider Fachgesellschaften finden sich u. a. nicht nur in einer unterschiedlichen Medienzusammensetzung und / oder Inkubationsdauer, sondern auch in der Festsetzung jeweils spezies-spezifischer Breakpoints (BP) [115-117]. Diese sind als diejenigen MHK-Werte definiert, anhand welcher eine klinische Einteilung in -S- (sensibel), -I- (intermediär nach CLSI; sensibel bei erhöhter Dosierung nach EUCAST) und -R- (resistent) erfolgt (Tab.11) [97, 118]. BP dienen somit als Prädiktor für einen Therapieerfolg *in vivo* durch eine Resistenztestung *in vitro*. Gleichzeitig geben sie Aufschluss über ein wahrscheinliches Therapieversagen. Die Determination und Adaptation von BP für eine Spezies ist ein multifaktorieller und diffiziler Prozess, bei welchem u. a. folgende Überlegungen eine Rolle spielen: Das Vorhandensein intrinsischer Resistenzen oder verschiedener Resistenzmechanismen, die Art der Infektion, die Häufigkeit des Pathogens, die MHK-Wert Distribution der Wildtyp Population und die MHK-Wert Distribution der resistenten Population, klinische Outcome-Daten, die jeweilige Pharmakodynamik und -kinetik des Antimykotikums, die erreichten Wirkspiegel am Infektionsort [97, 118, 119].

Für die Praxis ist dies insofern von Relevanz, als dass bei Befunden und deren klinischer Interpretation die jeweils für die Methode validierten BP genutzt werden sollten. Aufgrund der Komplexität und Ressourcenintensität der hier vorgestellten Protokolle werden diese häufig nur von Referenzzentren angeboten. Ferner sei bemerkt, dass sich, trotz der Differenzen beider Protokolle, Bestrebungen mehren, welche eine Harmonisierung und Angleichung beider Fachgesellschaften fordern, um u. a. einheitliche BP zu etablieren [120].

1.3.2 Kommerzielle Methoden

Im täglichen Routineeinsatz erleichtert eine diverse Auswahl kommerzieller Systeme die antimykotische Resistenztestung. Zu ihnen zählen bereits zur Mikrodilution maschinell vorgefertigte und mit Antimykotika bestückte Mikrotiterplatten (Micronaut von Merlin Bruker unter 2.1.9; Yeast-One von Fisher Scientific unter 2.1.10), halbautomatische Testsysteme mit modularen Testkarten (Abb.4) (VITEK2 mit AFST-YS08 von bioMérieux unter 2.1.11) oder Epsilon-Teststreifen (Etest von bioMérieux unter 2.1.12), welche mittels eines Substanzgradienten Antimykotika-Empfindlichkeiten prüfen. Bezüglich der detaillierten Funktionsweise derselben wird auf das jeweilige Unterkapitel des Abschnitts 2 Material und Methoden verwiesen.

Im Vergleich zur Referenzmethode zeichnen sich alle vorgestellten kommerziellen Resistenztestungen vor allem durch eine gute Komparabilität, Verfügbarkeit und vereinfachte Bedienweise aus [121-123]. So ist es jedem Routinelaboratorium mit wenigen zusätzlichen Hilfsmitteln möglich diese durchzuführen. Als Nachteile sind - je nach Verfahren - u. a. Messfehler, Ungenauigkeiten in der Ablesung oder für einzelne Antimykotika ungenügende Validation in Bezug zur Referenzmethode anzuführen [124, 125].



Abb.4: Automatisches VITEK2-Testsystem (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) mit Inkubator-Karussell (links) zur Aufnahme und Bebrütung von AFST-YS08 Resistenzkarte (rechts).

1.3.3 Genotypisierung

Die lange Dauer (24-48h) aller vorgestellten phänotypischen Resistenztestungen limitieren deren Einfluss in Bezug auf schnelle, unter Umständen lebensrettende, patienten*innen-orientierte Therapieentscheidungen. Ferner mindern kürzlich beobachtete Überlappungen von Wildtyp- und *FKS*-mutierten Populationen den Wert von *in vitro* Tests als verlässlichen Prädiktor einer relevanten Mutation [125-127]. Sich auf diese Problematik beziehend fordern einige Autoren die Etablierung molekularer Testverfahren, um phänotypische Echinocandin-Resistenzen auf der Grundlage von *FKS* HS-Mutationen zu identifizieren. Der größte Vorteil dieser ist eine kurze Durchführbarkeitsdauer von ca. drei Stunden. Ferner scheint die molekulare Analyse ein Therapieversagen präziser vorherzusagen als phänotypische Tests [113, 126, 128]. Für *Candida* Spezies befinden sich solche Testverfahren jedoch zurzeit in experimentellen Stadien und werden in der Routinediagnostik nicht eingesetzt [126].

1.4 Ziele der Arbeit

Vor dem in der Einleitung skizzierten Problemhintergrund bedingen sich nachstehend zu benennende Ziele:

In dieser Studie soll die aktuelle Situation phänotypischer und genotypischer Echinocandin-Resistenzen klinisch relevanter *C. glabrata* Stämme aus Deutschland im Zeitraum zwischen 2015 und 2019 beleuchtet werden. Schwerpunkte liegen auf Differenzen spezifischer Mutationen und damit verbundener phänotypischer Resistenzmerkmale, der Relevanz verschiedener Testmethoden und dem Auftreten von multiresistenten Stämmen. Ferner ist ein Protokoll zu etablieren, um *C. glabrata*-SCV in der täglichen Routinediagnostik des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg zuverlässig zu identifizieren.

Hierzu gilt es u. a. folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Wie ist der Stellenwert phänotypischer Resistenzverfahren im Vergleich zu Genotypisierungen zu beurteilen?
2. Werden Unterschiede in der Diskriminationsauflösung zwischen *FKS*-Wildtyp- und *FKS*-Mutanten-Populationen in Bezug auf die Anwendung verschiedener Echinocandine in der phänotypischen Resistenztestung gesehen?
3. Ist eine Zuordnung bestimmter genotypischer Phänotypen zu erhöhten oder erniedrigten MHK-Werten bestimmter Echinocandine möglich?
4. Halten die Paradigmen einer ausschließlich *FKS*-HS vermittelten Echinocandin-Resistenz und einer Kreuzresistenz innerhalb der Substanzklasse im Kontext klinischer Isolate stand?
5. Sind *C. glabrata*-SCV in klinischen Isolaten vertreten und wie können diese asserviert werden?
6. Stellt die weltweite Zunahme von MDR-Resistenzen ebenfalls in Deutschland eine ernstzunehmende Problematik dar?

2 Material und Methoden

2.1 *C. glabrata* Stammsammlung des NRZMyk

Das Nationale Referenzzentrum für Invasive Pilzinfektionen (NRZMyk) dient als Referenzlabor für Deutschland. 176 *C. glabrata*-Stämme, welche zwischen 2015 und 2019 von deutschen Gesundheitseinrichtungen und Laboratorien zur Artbestätigung sowie Resistenzüberprüfung an das NRZMyk versandt wurden, fanden Eingang in die Analyse dieser Studie (Tab.2). Abgesehen von den Isolaten CG47 und CG48, bei denen es sich um zwei divergente Klone einer Patientin handelt, welche unterschiedliche *FKS*-Mutationen aufweisen, wurden nur die Erstisolate einzelner Patienten*innen in dieser Arbeit berücksichtigt.

Tab.2: 178 *C. glabrata*-Isolate aus der Stammsammlung des Nationalen Referenzzentrums für Invasive Pilzinfektionen zwischen 2015 und 2019. Exkludierte Daten in grau und mit (*) - Stern markiert. Abkürzungen: Anidulafungin (AND); Blutkultur (BK); Caspofungin (CAS); Fluconazol (FLC); Fremdkörpermaterial (FK) Geschlecht (Gesch.); Respirationstrakt (Resp.); keine Angabe (k. A.).

| NRZ-ID | Ge- sch. | Alter | Probe | AND (mg/L) | CAS (mg/L) | FLC (mg/L) | Mutation in <i>FKS</i> |
|--------|-------------|-------|---------|---------------|---------------|---------------|---------------------------|
| CG113 | m | 51-55 | Abdomen | 0.125 | 0.5 | 1 | Keine (Borderline) |
| CG37 | m | 66-70 | BK | 0.03 | k. A. | 2 | - |
| CG38 | m | 51-55 | BK | 0.03 | k. A. | 2 | - |
| CG39 | m | 51-55 | BK | ≤0.016 | k. A. | 4 | - |
| CG40 | w | 86-90 | Abdomen | ≤0.016 | k. A. | 1 | - |
| CG33 | m | 61-65 | BK | 0.016 | k. A. | 1 | - |
| CG34 | w | 61-65 | BK | 0.016 | k. A. | 2 | - |
| CG35 | w | 61-65 | Resp. | 1 | 8 | 2 | F659S (FKS2 HS1) |
| CG36 | w | 61-65 | BK | 0.016 | k. A. | 0.25 | - |
| CG29 | w | 51-55 | Abdomen | 1 | 4 | 64 | S629P (FKS1 HS1) |

| | | | | | | | |
|-------|---|-------|---------|--------|-------|-----|--------------------|
| CG30 | w | k. A. | Abdomen | ≤0.016 | k. A. | 4 | - |
| CG31 | m | 61-65 | Andere | 0.5 | 1 | 64 | F659S (FKS2 HS1) |
| CG32 | m | 71-75 | FK | 0.25 | 1 | >64 | F659S (FKS2 HS1) |
| CG4 | w | 71-75 | Urin | 0.5 | >8 | 0,5 | F659del (FKS2 HS1) |
| CG1 | m | 31-35 | Abdomen | ≤0.016 | k. A. | 1 | - |
| CG114 | m | 76-80 | BK | 0.125 | 0.125 | 1 | Keine (Borderline) |
| CG2 | m | 46-50 | Abdomen | 2 | 8 | 32 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG115 | w | 16-20 | Andere | 0.125 | 0.25 | 2 | Keine (Borderline) |
| CG3 | m | 71-75 | BK | 2 | >8 | 8 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG17 | w | 21-25 | Andere | 1 | 2 | 64 | F625S (FKS1 HS1) |
| CG90 | m | 61-65 | BK | 0.06 | k. A. | >64 | - |
| CG154 | w | 81-85 | BK | ≤0.016 | k. A. | 64 | - |
| CG155 | w | 66-70 | BK | ≤0.016 | k. A. | 64 | - |
| CG18 | w | 61-65 | BK | 0.03 | k. A. | 8 | - |
| CG19 | w | 41-45 | Urin | 0.03 | k. A. | 8 | - |
| CG93 | w | 46-50 | BK | 0.03 | k. A. | ≥64 | - |
| CG20 | w | 46-50 | BK | 4 | >8 | >64 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG94 | m | 81-85 | BK | 0.03 | k. A. | 8 | - |
| CG16 | w | 61-65 | BK | 4 | >8 | >64 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG13 | m | 66-70 | BK | 0.016 | k. A. | 8 | - |
| CG193 | m | 56-60 | Resp. | 0.016 | k. A. | ≥64 | - |
| CG95 | m | 56-60 | BK | 0.03 | k. A. | ≥64 | - |
| CG14 | m | 86-90 | FK | 0.016 | k. A. | 8 | - |
| CG11 | w | 76-80 | Andere | ≤0.016 | k. A. | 32 | - |
| CG12 | w | 26-30 | Abdomen | 1 | 4 | 16 | F625S (FKS1 HS1) |
| CG9 | w | 81-85 | BK | 4 | >8 | 16 | F659del (FKS2 HS1) |
| CG10 | m | 51-55 | FK | 1 | 1 | 32 | D666E (FKS2 HS1) |
| CG6 | m | 76-80 | BK | 0.5 | 2 | >64 | F659S (FKS2 HS1) |
| CG7 | m | 71-75 | k. A. | 0.03 | k. A. | 32 | - |
| CG116 | w | 66-70 | BK | 0.125 | 0.5 | 8 | Keine (Borderline) |
| CG8 | m | 56-60 | BK | ≤0.016 | k. A. | 16 | - |
| CG156 | w | 81-85 | BK | ≤0.016 | k. A. | >64 | - |
| CG5 | m | 41-45 | Abdomen | 2 | >8 | 8 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG28 | w | 61-65 | Urin | 2 | >8 | >64 | F659V (FKS2 HS1) |
| CG97 | w | 76-80 | Abdomen | 0.03 | k. A. | 8 | - |
| CG26 | m | 61-65 | Abdomen | ≤0.016 | k. A. | 8 | - |
| CG27 | w | 66-70 | Urin | 2 | >8 | 8 | S663P (FKS2 HS1) |

| | | | | | | | |
|-------|----|--------|----------|--------|-------|-----|---------------------|
| CG21 | m | 71-75 | Urin | 2 | >8 | 4 | S663F (FKS2 HS1) |
| CG22 | m | 61-65 | BK | 0.5 | 1 | 32 | Keine (Borderline) |
| CG23 | m | 41-45 | Abdomen | 0.5 | 4 | >64 | F659S (FKS2 HS1) |
| CG24 | w | 61-65 | BK | 0.03 | k. A. | 8 | - |
| CG47 | w | 71-75 | Abdomen | 1 | 2 | 16 | F659C (FKS2 HS1) |
| CG48 | w* | 71-75* | Abdomen* | 1 | 8 | >64 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG49 | m | 61-65 | Andere | ≤0.016 | k. A. | 8 | - |
| CG157 | m | 56-60 | BK | 0.016 | k. A. | 16 | - |
| CG99 | m | 61-65 | Resp. | 0.06 | k. A. | 64 | - |
| CG100 | m | k. A. | BK | 0.06 | k. A. | 16 | - |
| CG41 | w | 76-80 | Abdomen | 1 | 8 | 8 | S629P (FKS1 HS1) |
| CG42 | w | 56-60 | BK | 1 | >8 | 8 | F659del (FKS2 HS1) |
| CG101 | w | 56-60 | BK | 0.03 | k. A. | 32 | - |
| CG158 | w | 71-75 | Resp. | ≤0.016 | k. A. | >64 | - |
| CG102 | m | 51-55 | BK | 0.03 | k. A. | 32 | - |
| CG43 | m | 51-55 | Abdomen | 0.5 | 2 | 32 | F659Y (FKS2 HS1) |
| CG46 | m | 51-55 | Abdomen | 0.5 | 2 | 32 | F659Y (FKS2 HS1) |
| CG159 | w | 71-75 | Abdomen | ≤0.016 | k. A. | 32 | - |
| CG44 | m | 61-65 | Abdomen | 1 | 2 | 8 | L662W (FKS2 HS1) |
| CG160 | m | 71-75 | BK | ≤0.016 | k. A. | >64 | - |
| CG52 | m | 46-50 | Abdomen | 0.03 | k. A. | 4 | - |
| CG103 | m | 81-85 | Resp. | 0.03 | k. A. | 16 | - |
| CG53 | w | 46-50 | BK | 2 | >8 | 32 | F659del (FKS2 HS1) |
| CG54* | w* | 46-50* | BK* | 2* | >8* | 32* | F659del (FKS2 HS1)* |
| CG55 | w | 61-65 | BK | 0.125 | 0.5 | 8 | Keine (Borderline) |
| CG56 | w | 61-65 | k. A. | 2 | 4 | >64 | Keine (Borderline) |
| CG45 | w | 71-75 | FK | ≤0.016 | k. A. | 2 | - |
| CG195 | w | 71-75 | k. A. | ≤0.016 | k. A. | 64 | - |
| CG57 | m | 66-70 | BK | 0.06 | k. A. | 64 | - |
| CG161 | m | 41-45 | BK | ≤0.016 | k. A. | 16 | - |
| CG104 | m | 71-75 | Urin | 0.06 | k. A. | >64 | - |
| CG162 | m | 46-50 | k. A. | 0.06 | k. A. | >64 | - |
| CG196 | w | 51-55 | BK | ≤0.016 | k. A. | >64 | - |
| CG58 | m | 51-55 | BK | 2 | >8 | >64 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG163 | m | 86-90 | k. A. | ≤0.016 | k. A. | 16 | - |
| CG59 | m | 76-80 | Abdomen | 1 | 4 | 16 | L630Q (FKS1 HS1) |
| CG105 | m | 66-70 | BK | 0.03 | k. A. | >64 | - |

| | | | | | | | |
|-------|---|--------|---------|--------|-------|-----|--------------------|
| CG164 | m | 76-80 | BK | 0.125 | 0.5 | >64 | D666N (FKS2 HS1) |
| CG165 | m | 96-100 | BK | ≤0.016 | k. A. | 32 | - |
| CG60 | m | 61-65 | Andere | 0.016 | k. A. | >64 | - |
| CG106 | w | 71-75 | BK | 0.06 | k. A. | 8 | - |
| CG61 | m | 45-50 | BK | 2 | 2 | 4 | D632Y (FKS1 HS1) |
| CG62 | w | 81-85 | Abdomen | 2 | >8 | >64 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG166 | m | 81-85 | BK | 0.06 | k. A. | 4 | - |
| CG197 | w | 0-5 | Abdomen | 0.03 | k. A. | 8 | - |
| CG63 | m | 81-85 | BK | 0.03 | k. A. | 4 | - |
| CG64 | w | 71-75 | Andere | 0.125 | 0.5 | 8 | F659Y (FKS2 HS1) |
| CG65 | w | 26-30 | Abdomen | 0.5 | 1 | >64 | D666N (FKS2 HS1) |
| CG66 | w | 81-85 | Andere | 0.125 | 2 | 4 | F659Y (FKS2 HS1) |
| CG67 | w | 41-45 | Abdomen | 0.5 | 2 | 2 | F659Y (FKS2 HS1) |
| CG68 | m | 61-65 | k. A. | 2 | >8 | 4 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG69 | w | 66-70 | FK | 0.25 | 1 | 32 | D666Y (FKS2 HS1) |
| CG167 | m | 66-70 | Abdomen | 0.06 | k. A. | >64 | - |
| CG70 | w | 66-70 | Abdomen | 2 | >8 | 2 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG148 | w | 71-75 | Andere | 0.25 | 0.125 | 4 | Keine (Borderline) |
| CG71 | w | 51-55 | BK | 2 | >8 | 4 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG72 | m | k. A. | Andere | 0.06 | k. A. | 32 | - |
| CG73 | m | 46-50 | BK | 1 | 8 | >64 | F625C (FKS1 HS1) |
| CG149 | w | 76-80 | Andere | 0.06 | k. A. | 4 | - |
| CG168 | m | 81-85 | Andere | 0.06 | k. A. | 4 | - |
| CG107 | m | 66-70 | Abdomen | 0.03 | k. A. | 16 | - |
| CG75 | w | 56-60 | BK | 0.5 | 2 | 8 | F659S (FKS2 HS1) |
| CG169 | m | 31-35 | Resp. | 0.25 | 1 | 32 | Keine (Borderline) |
| CG108 | w | 66-70 | BK | 0.03 | k. A. | 64 | - |
| CG170 | m | 61-65 | Abdomen | 0.06 | k. A. | 8 | - |
| CG76 | m | 76-80 | Andere | 1 | 0.06 | 8 | F659V (FKS2 HS1) |
| CG77 | m | 56-60 | Abdomen | 1 | 1 | 8 | F659Y (FKS2 HS1) |
| CG78 | w | 66-70 | Abdomen | 0.5 | 1 | >64 | Keine (Borderline) |
| CG79 | m | 56-60 | Abdomen | 1 | 1 | 8 | L662W (FKS2 HS1) |
| CG80 | w | 41-45 | BK | 2 | >8 | 4 | S663W (FKS2 HS1) |
| CG81 | w | 56-60 | Abdomen | 0.06 | k. A. | 4 | - |
| CG109 | w | 61-65 | BK | 0.06 | k. A. | >64 | - |
| CG82 | m | 71-75 | Abdomen | 0.5 | 2 | 16 | R1378H (FKS2 HS2) |
| CG198 | m | 56-60 | Andere | 0.125 | 0.25 | 32 | F659L (FKS2 HS1) |

| | | | | | | | |
|----------|---|-------|---------|--------|-------|-----|--------------------|
| CG110 | w | 61-65 | BK | 0.06 | k. A. | 8 | - |
| CG150 | w | 26-30 | Resp. | 0.125 | k. A. | 2 | Keine (Borderline) |
| CG151 | m | 41-45 | Resp. | 0.125 | 0.125 | 8 | Keine (Borderline) |
| CG171 | m | 81-85 | BK | 0.06 | k. A. | 32 | - |
| CG172 | m | 66-70 | Abdomen | 0.06 | k. A. | >64 | - |
| CG83 | m | 61-65 | Abdomen | 0.25 | 0.5 | 8 | Keine (Borderline) |
| CG84 | w | 0-5 | BK | 1 | 1 | 2 | F659S (FKS2 HS1) |
| CG85 | m | 76-80 | Urin | 4 | >8 | 16 | F659del (FKS2 HS1) |
| CG86 | m | 66-70 | Abdomen | 0.06 | k. A. | 8 | - |
| 2018-370 | m | 31-35 | Urin | 2 | >8 | 4 | S663P (FKS2 HS1) |
| 2018-375 | m | 66-70 | BK | 1 | 8 | 4 | F659V (FKS2 HS1) |
| CG173 | m | 31-35 | Abdomen | 4 | >8 | 8 | F659del (FKS2 HS1) |
| CG174 | m | 76-80 | BK | 0.03 | k. A. | 4 | - |
| CG175 | w | 76-80 | Urin | 0.03 | k. A. | 4 | - |
| CG152 | m | 56-60 | BK | 0.5 | 2 | 64 | P667T (FKS2 HS1) |
| CG176 | w | 86-90 | Abdomen | 0.03 | k. A. | 2 | - |
| 2018-513 | w | 71-75 | FK | 2 | >8 | 4 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG153 | m | 21-25 | BK | 1 | 1 | 4 | P667T (FKS2HS1) |
| 2018-601 | m | 36-40 | BK | 2 | >8 | 8 | F659del (FKS2 HS1) |
| 2018-606 | m | 71-75 | Andere | 2 | >8 | 4 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG177 | m | 76-80 | BK | ≤0.016 | k. A. | 4 | - |
| CG178 | m | 36-40 | Andere | 0.06 | k. A. | 2 | - |
| 2019-034 | w | 66-70 | Urin | 4 | >8 | 4 | S663P (FKS2 HS1) |
| 2019-046 | m | 76-80 | Andere | 2 | 4 | 16 | F625S (FKS1 HS1) |
| CG216 | w | 56-60 | BK | 0.03 | k. A. | 4 | - |
| 2019-101 | w | 66-70 | BK | >8 | >8 | 8 | R1378S (FKS2 HS2) |
| CG179 | m | 71-75 | Abdomen | 0.06 | k. A. | 8 | - |
| CG217 | m | 41-45 | BK | ≤0.016 | k. A. | 16 | - |
| 2019-198 | m | 56-60 | Abdomen | 2 | >8 | 16 | S663P (FKS2 HS1) |
| CG218 | m | 46-50 | Resp. | 0.03 | k. A. | 16 | - |
| CG180 | m | 66-70 | BK | 0.06 | k. A. | >64 | - |
| 2019-222 | w | 51-55 | Abdomen | 2 | >8 | 8 | F659del (FKS2 HS1) |
| CG181 | w | 71-75 | Resp. | 0.016 | k. A. | 32 | - |
| CG191 | w | 71-75 | Resp. | 0.03 | k. A. | 4 | - |
| CG219 | m | 66-70 | BK | ≤0.016 | k. A. | 16 | - |
| 2019-243 | m | 56-60 | Andere | 1 | 2 | 16 | F625S (FKS1 HS1) |
| CG199 | m | 56-60 | Urin | ≤0.016 | k. A. | 8 | - |

| | | | | | | | |
|-----------|-------|--------|---------|--------|-------|-----|--------------------|
| 2019-323 | w | 51-55 | Andere | 4 | >8 | 8 | S663P (FKS2 HS1) |
| 2019-327 | m | 66-70 | FK | 0.25 | 1 | 8 | D666H (FKS2 HS1) |
| CG182 | m | 76-80 | Andere | 0.03 | k. A. | >64 | - |
| CG183 | w | 71-75 | Andere | 0.06 | k. A. | 4 | - |
| CG184 | w | 81-85 | BK | 0.03 | k. A. | 8 | - |
| CG185 | w | 56-60 | Resp. | 0.016 | k. A. | >64 | - |
| 2019-378 | w | 46-50 | Abdomen | 4 | >8 | 4 | S663P (FKS2 HS1) |
| 2019-400 | m | 51-55 | Andere | 2 | >8 | >64 | S663P (FKS2 HS1) |
| 2019-421 | m | 66-70 | Abdomen | 0.125 | 2 | >64 | F659L (FKS2HS1) |
| 2019-562* | w* | 51-55* | Andere* | 2* | >8* | 4* | S663P (FKS2 HS1)* |
| CG200 | w | 86-90 | Abdomen | ≤0.016 | k. A. | 32 | - |
| CG186 | w | 76-80 | Urin | ≤0.016 | k. A. | 64 | - |
| 2019-605 | w | 61-65 | BK | 0.125 | 1 | 4 | F659S (FKS2 HS1) |
| 2019-615 | m | 76-80 | BK | 1 | >8 | 32 | F659del (FKS2 HS1) |
| CG201 | m | 56-60 | Andere | ≤0.016 | k. A. | 32 | - |
| CG187 | m | 51-55 | BK | 0.03 | k. A. | >64 | - |
| CG202 | k. A. | 51-55 | Abdomen | 0.03 | k. A. | 8 | - |
| CG190 | w | 36-40 | BK | ≤0.016 | k. A. | 16 | - |
| CG189 | m | 6-10 | Urin | ≤0.016 | k. A. | 4 | - |
| CG188 | m | 56-60 | BK | ≤0.016 | k. A. | 16 | - |

2.1.1 Medien und *Candida*-Kulturen

Nach Erhalt der *Candida*-Stämme auf YPD-Schrägagar (Hefeextrakt-Pepton-Glukose-Agar) wurden diese zum Zwecke der Langzeitaufbewahrung kryokonserviert. Hierzu wurden 500 µl 50-prozentiges Glycerin, 250 µl YPD-Flüssigmedium und 250 µl Zellsuspension aus einer zuvor für jedes Isolat angesetzten Übernachtskultur (s. u.) in einem 1,5 ml fassenden Schraubdeckelgefäß zusammengeführt, gelegentlich mechanisch vermengt und nach ca. 30-minütiger Inkubation unter Raumtemperatur bei -80 °C schockgefroren. Die so asservierten Stämme konnten - unter Verwendung eines Eisbades - vielmals auf ca. 0 °C angetaut werden, wobei ca. 10 µl Suspension mit der Impföse entnommen wurde, um ebendiese auf Nährmedien zwecks Anzucht frischer Hefekulturen zu überführen.

Generell wurden zur mittelfristigen Nutzung und Lagerung der Hefekulturen YPD-Festmedien (Zusammensetzung in Tab.3) verwendet. Nach 3-Ösenausstrich fand eine Bebrütung der Platten bei 35 °C für 24 h statt. Anschließend wurden diese bei 7 °C deponiert.

Vor der Ausführung von in dieser Arbeit durchgeführten Resistenztestungen wurden - je nach Vorgabe - frische Übernachtskulturen der entsprechenden Isolate angesetzt. Hierzu wurden mit der Impföse 3-5 Einzelkolonien in 5 ml YPD-Flüssigmedium (Zusammensetzung in Tab.4) überführt und für 24 h bei 180 U / min und 35 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Falls für das jeweilige Protokoll erforderlich, wurde ebenfalls die Anzucht auf Festmedien mittels 3-Ösenausstrich ergänzt.

Tab.3: Mengenangaben zur Herstellung von 500 ml YPD-Festmedium. Die Feststoffe werden in 500 ml Aqua dest. gelöst.

| YPD-Festmedium | |
|-----------------------|-----|
| Glucose | 10g |
| Pepton | 10g |
| Agar | 10g |
| Hefeextrakt | 5g |

Tab.4: Mengenangaben zur Herstellung von 500 ml YPD-Flüssigmedium. Die Feststoffe werden zunächst in 300 ml Aqua dest. gelöst. Es folgt die pH 5 Einstellung mittels HCL und das weitere Hinzufügen von Aqua dest. bis 500 ml Gesamtvolumen. Abschließend wird die Flüssigkultur sterilfiltriert.

| YPD-Flüssigmedium | |
|--------------------------|-----|
| Glucose | 10g |
| Pepton | 10g |
| Hefeextrakt | 5g |

2.1.2 DNA-Extraktion

Alle Isolate wurden auf YPD-Festmedium ausgestrichen und für 24 h bei 35 °C inkubiert. Anschließend wurde Pilzmaterial (ein für 5 min bei 10000 Umdrehungen abzentrifugiertes Pellet aus 1 ml YPD Übernachtskultur) unter der Sicherheitswerkbank in ein, mit ca. 400 µl sterilen Glasperlen versetztes und 500 µl Lysispuffer befülltes, steriles Gefäß (1,5 ml) überführt. Nach 5-minütigem Schreddern mittels Vortex erfolgte eine ca. einstündige Inkubation im Thermoblock bei 68 °C unter gelegentlich wiederholtem Schütteln. Die Tubes wurden 10 min bei 16000 Umdrehungen zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt, mit 225 µl 3M Natriumacetat versetzt und mehrfach invertiert. Im Anschluss erfolgte die 10-minütige Inkubation bei -20 °C, die 10-minütige Zentrifugation bei 16000 Umdrehungen und das abermalige Überführen des Überstandes in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß. Nun wurde das gleiche Volumen an Isopropanol (≥99,5%) hinzugefügt, mittels Inversion vermennt, bei 15 min Raumtemperatur inkubiert, 10 min bei 16000 Umdrehungen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Hiernach erfolgten zwei sich wiederholende Waschschrirte, in welchen mit 200 µl Isopropanol (70 %) eluiert und bei 16000 Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Das nach der letzten Zentrifugation erzeugte Pellet wurde im Thermoblock bei 35 °C vollständig getrocknet und schlussendlich in 50 µl Aqua dest. resuspendiert. Die Aufbewahrung der auf diese Weise gewonnenen DNA erfolgte bei -20 °C.

2.1.3 PCR-Protokolle

Die gewonnene DNA wurde, wie in Tabelle 5 und 6 beschrieben, angesetzt und amplifiziert. Die Durchführung aller PCR-Reaktionen erfolgte auf einem TProfessional Trio PCR Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tab.5: Ansatz *ITS*-PCR. Alle PCR-Reaktionen erfolgten mit Hilfe eines TProfessional Trio PCR Thermocyclers (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland).

| PCR-Ansatz | PCR-Programm |
|---|--|
| 25µl Q5 2x Mastermix 1µl ITS1 10pmol/µl 1µl ITS4 10pmol/µl 1µl isolierte DNA 22µl RNase-freies Wasser | 6' 95°C 1' 95°C 1' 55°C 1' 72°C 10' 72°C ∞ 16°C |

Tab.6: Ansatz *FKS*-PCR. Alle PCR-Reaktionen erfolgten mit Hilfe eines TProfessional Trio PCR Thermocyclers (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Die mit (x) markierten Stellen beziehen sich auf Platzhalter für die jeweils verwendeten Primerpaare und deren spezifischer Schmelztemperatur, welche Tabelle 7 zu entnehmen sind.

| PCR-Ansatz | PCR-Programm |
|---|---|
| 25µl Q5 2x Mastermix 1µl CgFKSx-HSx-f 10pmol/µl 1µl CgFKSx-HSx-r 10pmol/µl 1µl isolierte DNA 22µl RNase-freies Wasser | 6' 95°C 1' 95°C 1' x°C 1' 72°C 10' 72°C ∞ 16°C |

Tab. 7: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer in 5'/3' Richtung. Spezifische Schmelztemperatur in °C (T_m in °C). Die Bestimmung erfolgte durch OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

| Primer | T_m in °C | Sequenz |
|---------------|----------------------------|---------------------------|
| ITS1 | 55,4 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG |
| ITS4 | 49,7 | TCCTCCGCTTATTGATATGC |
| CgFKS1-HS1-f | 56,3 | CCATTGGGTGGTCTGTTACAG |
| CgFKS1-HS1-r | 54,4 | GATTGGGCAAAGAAAGAAATACGAC |
| CgFKS1-HS2-f | 53,5 | GGTATTTCAAAGGCTCAAAGGG |
| CgFKS1-HS2-r | 55,9 | ATGGAGAGAACAGCAGGGCG |
| CgFKS2-HS1-f | 53,5 | GTGCTCAACATTTATCTCGTAGG |
| CgFKS2-HS1-r | 55,3 | CAGAATAGTGTGGAGTCAAGACG |
| CgFKS2-HS2-f | 52,4 | CGTAGACCGTTTCTTGACTTC |
| CgFKS2-HS2-r | 50,3 | CTTGCCAATGTGCCACTG |

2.1.4 Gelelektrophorese

Entsprechende PCR-Produkte wurden mit Hilfe von 1-prozentigen Agarosegelen durch Elektrophorese visualisiert und kontrolliert. Hierzu wurden je nach Größe der verwendeten Gelkammer 1 x TAE Puffer (Karl Roth) und Agarose im richtigen Verhältnis (z. B. für ein kleines 1-prozentiges Gel: 50 ml 1 x TAE Puffer + 0,5 g Agarose) suspendiert, aufgekocht und in eine entsprechende Form unter Zugabe von Midori Green Advance (5 µl je 100 ml Gel; Biozym, Ref: 617006) gegossen. Die ausgesparten Taschen wurden mit jeweils 5 µl PCR-Produkt und 1 µl Lade-Puffer (6 x Gel Loading Dye Purple; New England BioLabs) sowie einmalig 7 µl einer 1kb „DNA-Leiter“ (Quick-Load Purple 1kb DNA Ladder; New England BioLabs) beschickt. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung durch eine entsprechende mit 1 x TAE Puffer gefüllte Kammer von Analytik Jena und einer angelegten Spannung (je nach Gelgröße) von 80-120 V. Die Visualisierung und Fotodokumentation der aufgetrennten DNA-Banden gelang unter Verwendung des UVP GelStudio (Analytik Jena). Abbildung 5 zeigt beispielhaft eine ebensolche gelelektrophoretische Auftrennung.

2.1.5 DNA-Aufreinigung und Sequenzierung

PCR-Produkte (spezifische Banden) wurden nach der Gelelektrophorese mit Hilfe eines kommerziellen Kits nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up) aufgereinigt und in 30 µl Aqua dest. eluiert. Durch die LGC Genomics GmbH (Berlin) erfolgte die Sequenzierung nach der Sanger Methode. Hierzu wurden 10 µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 3 µl Aqua dest. und 2 µl des jeweiligen Primers (Tab.7) in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß versandt.

2.1.6 Spezies-Identifizierung

Die Speziesidentifikation erfolgte durch Sequenzierung des internen transkribierten Spacers der ribosomalen DNA (ITS-rDNA) für alle inkludierten Isolate. Die in 2.1.2 extrahierte DNA wurde mittels PCR (2.1.3 und Tab.5) unter Verwendung der Primer ITS1 und ITS4 amplifiziert (Tab.7). Eine Gelelektrophorese, Aufreinigung und Sequenzierung des Amplifikats erfolgte wie in 2.1.4 und 2.1.5 skizziert. Zur Sequenzierung wurde der Primer ITS1 eingesetzt. Für die Bearbeitung der Sequenzen wurde das Programm SeqMan Version 11.0.0 (DNASar; Lasergene) verwendet. Die Identifizierung der Spezies wurde mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tool (nucleotide BLAST: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bestätigt. Als Referenzsequenz diente der *C. glabrata* Typus-Stamm: CBS138 / ATCC2001. Alle Isolate wiesen eine Identität ≥99 % im Vergleich zur Referenzsequenz auf.

2.1.7 FKS-Gensequenzierung

Die HS des *FKS*-Gens wurden für alle Isolate amplifiziert (2.1.3 Tab.6). Die jeweiligen Produkte in die Gelelektrophorese eingesetzt (2.1.4 Abb.5), aufgereinigt und sequenziert (2.1.5). Als Primer dienten für *FKS1*-HS1 die Paare CgFKS1-HS1-f und CgFKS1-HS1-r, für *FKS1*-HS2 die Paare CgFKS1-HS2-f und CgFKS1-HS2-r, für *FKS2*-HS1 die Paare CgFKS2-HS1-f und CgFKS2-HS1-r sowie für *FKS2*-HS2 die Paare CgFKS2-HS2-f und CgFKS2-HS2-r (Tab.7). Sequenziert wurde mit beiden Primerpaaren sowohl forward als auch reverse. Relevante HS-Mutationen konnten mit der Software ApE- A plasmid Editor v1.17. identifiziert werden.

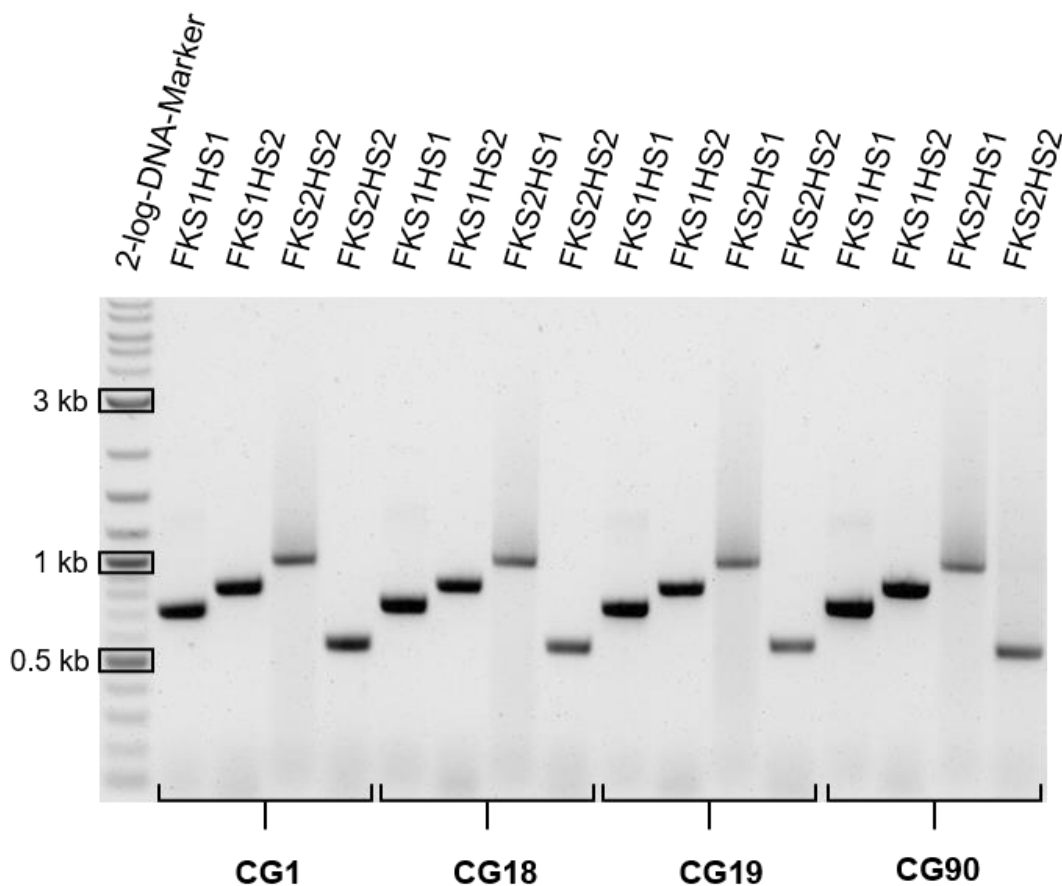


Abb.5: Gelelektrophorese nach *FKS*-PCR zur Kontrolle der Länge des Amplifikats am Beispiel der *C. glabrata*-Stämme CG1, CG18, CG19 und CG90. Erwartete Banden bei 0,725 kb (*FKS1*-HS1); 0,835 kb (*FKS1*-HS2); 0,981 kb (*FKS2*-HS1); 0,560 kb (*FKS*-HS2). Abkürzung: Kilobasenpaare (kb).

2.1.8 Referenzmikrodilution nach EUCAST

Die initiale *in vitro* Resistenztestung wurde mit dem Referenzverfahren Mikrobouillondilution (kurz Mikrodilution) gemäß EUCAST-Protokoll: „method for susceptibility testing of yeasts v. 7.3.2“ durchgeführt [115]. Die dafür erforderlichen Antimykotika Fluconazol und Anidulafungin als Reinsubstanzen wurden von der Firma Pfizer Inc. (Peapack, NJ, USA) zur Verfügung gestellt. Die Firma MSD (Rahway, NJ, USA) stellte Caspofungin als Reinsubstanz zur Verfügung. 96-well Mikrotiterplatten wurden gemäß Protokoll mit 100 µl RPMI-Flüssigmedium + 2 % Glukose und 100 µl des entsprechenden Antimykotikums (in zweifacher finaler Konzentration) versehen. Die Antimykotika Konzentrationen wurden anhand einer geometrischen Verdünnungsreihe von 0,032 mg/L bis 16 mg/L eingestellt, um finale Verdünnungsstufen in einer Spannweite von 0,016 mg/L bis 8 mg/L zu erzielen (Abb.6). Als Wachstumskontrolle wurden in einer Kavität 100 µl Medium + 100 µl Aqua dest. hinzugefügt. Die Lagerung der Mikrotiterplatten betrug nicht mehr als 6 Monate bei -80 °C, um eine regelgerecht fungizide Wirkung der Antimykotika zu garantieren. Das endgültige Inokulum lag zwischen $0,5-2,5 \times 10^5$ KBE/ml. Die MHK-Werte wurden nach 24 Stunden Inkubation bei 35 °C mittels Nephelometer (Labsystems Nepheloskan Anscnt Microplate Reader Type 750) abgelesen, wobei der Endpunkt des Wachstums als eine ≥ 50 -prozentige Hemmung im Vergleich zur wirkstofffreien Kontrolle definiert wurde (MHK50).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|-------|------|------|-------|------|-----|---|----|----|----|----|
| A | WK | 0,016 | 0,03 | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | WK | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Abb.6: Mikrodilution nach EUCAST: Schematische Belegung der 96-Well-Mikrotiterplatte. Darstellung der eingestellten Konzentrationsgradienten für: A2-A11 Anidulafungin und Caspofungin (in mg/L) und E2-E11 Fluconazol (in mg/L). A1 und E1 Wachstumskontrolle (WK).

2.1.9 Micronaut-AM (Merlin Bruker)

Der MICRONAUT-AM (Merlin Diagnostika- A Bruker Company, Bornheim, Deutschland) ist ein kommerzielles Kit zur *in vitro* Resistenztestung von Hefen, welches dem Referenzverfahren nach EUCAST entlehnt ist. Die Mikrotiterplatten sind bereits mit variablen Konzentrationen unterschiedlicher Antimykotika vorbestückt, sodass nur noch ein entsprechendes Inokulum sowie die entsprechenden bereitgestellten Medien und Reagenzien nach Angaben des Herstellers hinzugefügt werden mussten (Tab.8). Das RPMI-Flüssigmedium wurde mindestens 3 Stunden bei 35 °C vortemperiert. Zwecks visueller Auslesung wurden 100 µl AST-Indikator und 50 µl Methylenblau Lösung supplementiert. Als Inokulum fungierten 10 µl einer 0,5 McFarland Hefesuspension (DensiCHEK Plus, BioMérieux), welche ebenfalls dem Medium hinzugefügt wurden. Insgesamt 100 µl dieser Suspension wurden pro Kavität beimpft und die mit Folie versiegelten Platten für 24 h bei 35 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte visuell nach Farbschemata (blau = kein Wachstum; pink = Wachstum; entfärbt = starkes Wachstum). Die erste Kavität ohne Farbumschlag wurde als abzulesende MHK definiert. Eine 10 µl Einsaatkontrolle (aus der Positivkontrolle) wurde auf Sabouraud-Dextrose-Agar (Becton Dickinson) ausplattiert. Abbildungen 7 und 8 zeigen beispielhaft die Antimykotikabelegung der Mikrotiterplatten und deren Auswertung.

Tab.8: Notwendige Komponenten zur Verwendung des MICRONAUT-AM (Merlin Diagnostika- A Bruker Company, Bornheim, Deutschland).

| Medien | Bestandteile |
|--|------------------------------|
| NaCl 0.9% (1l) | Natriumchlorid |
| Spezielles Micronaut RPMI-1640 Medium (11,5ml) | RPMI-1640 MOPS Glucose |
| AST- Indikator (4ml) | Resazurin |
| Methylene blue solution (4ml) | Methylenblau |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A | WK | AMB 16 | AMB 8 | AMB 4 | AMB 2 | AMB 1 | AMB 0,5 | AMB 0,25 | AMB 0,125 | AMB 0,063 | AMB 0,031 | ITR 4 |
| B | NK | 5FC 32 | 5FC 16 | 5FC 8 | 5FC 4 | 5FC 2 | 5FC 1 | 5FC 0,5 | 5FC 0,25 | 5FC 0,125 | 5FC 0,063 | ITR 2 |
| C | FLC 128 | FLC 64 | FLC 32 | FLC 16 | FLC 8 | FLC 4 | FLC 2 | FLC 1 | FLC 0,5 | FLC 0,25 | FLC 0,125 | ITR 1 |
| D | VOR 8 | VOR 4 | VOR 2 | VOR 1 | VOR 0,5 | VOR 0,25 | VOR 0,125 | VOR 0,063 | VOR 0,031 | VOR 0,016 | VOR 0,008 | ITR 0,5 |
| E | POS 8 | POS 4 | POS 2 | POS 1 | POS 0,5 | POS 0,25 | POS 0,125 | POS 0,063 | POS 0,031 | POS 0,016 | POS 0,008 | ITR 0,25 |
| F | MIF 8 | MIF 4 | MIF 2 | MIF 1 | MIF 0,5 | MIF 0,25 | MIF 0,125 | MIF 0,063 | MIF 0,031 | MIF 0,016 | MIF 0,002 | ITR 0,125 |
| G | AND 8 | AND 4 | AND 2 | AND 1 | AND 0,5 | AND 0,25 | AND 0,125 | AND 0,063 | AND 0,031 | AND 0,016 | AND 0,002 | ITR 0,063 |
| H | CAS 8 | CAS 4 | CAS 2 | CAS 1 | CAS 0,5 | CAS 0,25 | CAS 0,125 | CAS 0,063 | CAS 0,031 | CAS 0,016 | CAS 0,002 | ITR 0,031 |

Abb.7: MICRONAUT-AM (Merlin Diagnostika- A Bruker Company, Bornheim, Deutschland): Schematische Belegung der 96-Well-Mikrotiterplatte. Darstellung der eingestellten Konzentrationsgradienten für (horizontal): A2-A11 Amphotericin B (in mg/L; Abk.: AMB); B2-B11 5-Fluorocytosin (in mg/L; Abk.: 5FC); C1-C11 Fluconazol (in mg/L; Abk.: FLC); D1-D11 Voriconazol (in mg/L; Abk.: VOR); E1-E11 Posaconazol (in mg/L; Abk.: POS); F1-F11 Micafungin (in mg/L; Abk.: MIF); G1-G11 Anidulafungin (in mg/L; Abk.: AND); H1-H11 Caspofungin (in mg/L; Abk.: CAS); A1 Wachstumskontrolle (WK); B2 Negativkontrolle (NK). Vertikal: 12A-12H Itraconazol (in mg/L; Abk.: ITR).

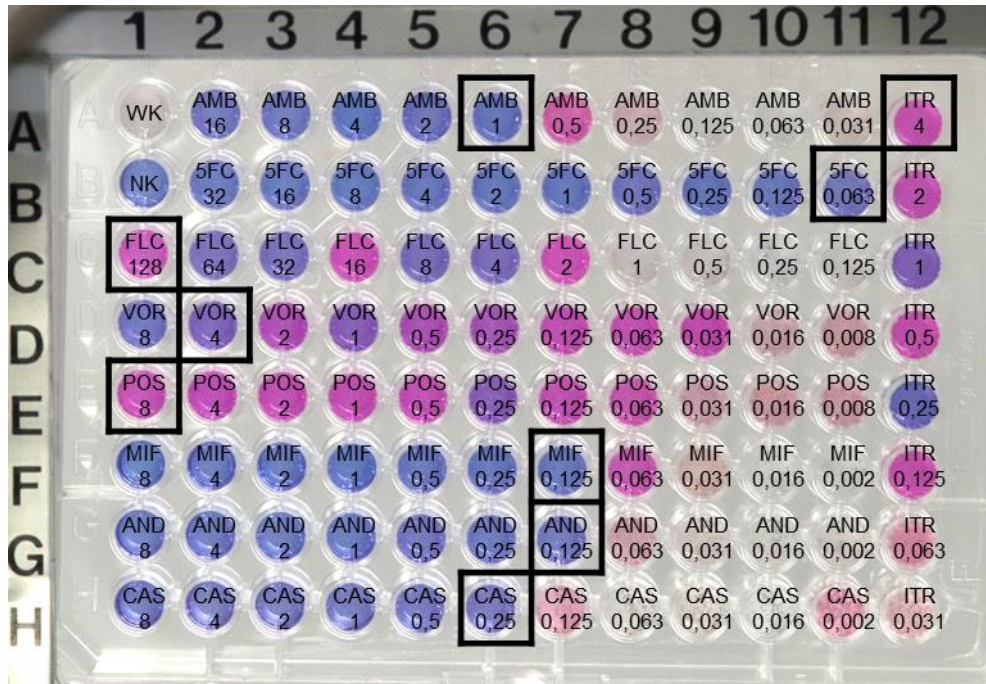


Abb.8: Beispielhafte Auswertung MICRONAUT-AM anhand von *C. glabrata*-Isolat CG56 nach 24 h Inkubation. Gemessene MHK-Werte in schwarzer Umrahmung: **G7)** Anidulafungin: 0,125 mg/L; **F7)** Micafungin: 0,125 mg/L; **H6)** Caspofungin: 0,25 mg/L; **C1)** Fluconazol: ≥ 128 mg/L; **A6)** Amphotericin B 1mg/L; **B11)** 5-Fluorocytosin: $\leq 0,063$ mg/L; **D2)** Voriconazol: 4 mg/L; **E1)** Posaconazol ≥ 8 mg/L; **A12)** Itraconazol: ≥ 4 mg/L.

Schematische Belegung der 96-Well-Mikrotiterplatte. Darstellung der eingestellten Konzentrationsgradienten für (horizontal): A2-A11 Amphotericin B (in mg/L; Abk.: AMB); B2-B11 5-Fluorocytosin (in mg/L; Abk.: 5FC); C1-C11 Fluconazol (in mg/L; Abk.: FLC); D1-D11 Voriconazol (in mg/L; Abk.: VOR); E1-E11 Posaconazol (in mg/L; Abk.: POS); F1-F11 Micafungin (in mg/L; Abk.: MIF); G1-G11 Anidulafungin (in mg/L; Abk.: AND); H1-H11 Caspofungin (in mg/L; Abk.: CAS); A1 Wachstumskontrolle (WK); B2 Negativkontrolle (NK). Vertikal: 12A-12H Itraconazol (in mg/L; Abk.: ITR).

2.1.10 Yeast-One (Fisher Scientific)

Der Sensititre-Yeast-One YO10 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), ist ein kommerzielles Kit zur *in vitro* Resistenztestung von Hefen, welches dem Referenzverfahren nach CLSI entlehnt ist. Die Mikrotiterplatten sind ebenfalls bereits mit variablen Konzentrationen unterschiedlicher Antimykotika und einem Farbindikator vorbestückt, sodass nur noch ein entsprechendes Inokulum sowie das entsprechend bereitgestellte Flüssigmedium nach Angaben des Herstellers hinzugefügt werden mussten (Tab.9). Hierzu wurde in 2 ml Aqua dest. eine 0,5 McFarland Hefesuspension via Densitometer (densiCHEK plus, bioMérieux) hergestellt und 20 µl ebendieser in 11 ml RPMI-Flüssigmedium gelöst. Alle Kavitäten wurden innerhalb von 15 min unter zweimaliger Resuspension beschickt, mit Folie abgeklebt und lichtgeschützt für 24 h bei 35 °C inkubiert. Als MHK galt die erste Kavität mit Farbumschlag im Vergleich zur Wachstumskontrolle (blau = kein Wachstum; pink = Wachstum). Eine 10 µl Einsaatkontrolle (aus der Positivkontrolle) wurde auf Sabouraud-Dextrose-Agar (Becton Dickinson) ausplattiert. In Abbildungen 9 und 10 sind beispielhaft sowohl die Antimykotikabelegung der Mikrotiterplatten als auch deren Auswertung illustriert.

Tab.9: Notwendige Komponenten zur Verwendung des Sensititre-Yeast-One YO10 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

| Medien | Bestandteile |
|---------------------------------------|------------------|
| Aqua dest. (1l) | H ₂ O |
| Spezielles RPMI-1640 Medium (11ml) | RPMI-1640 |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------|
| A | WK | AND 0,015 | AND 0,03 | AND 0,06 | AND 0,12 | AND 0,25 | AND 0,5 | AND 1 | AND 2 | AND 4 | AND 8 | AMB 0,12 |
| B | MIF 0,008 | MIF 0,015 | MIF 0,03 | MIF 0,06 | MIF 0,12 | MIF 0,25 | MIF 0,5 | MIF 1 | MIF 2 | MIF 4 | MIF 8 | AMB 0,25 |
| C | CAS 0,008 | CAS 0,015 | CAS 0,03 | CAS 0,06 | CAS 0,12 | CAS 0,25 | CAS 0,5 | CAS 1 | CAS 2 | CAS 4 | CAS 8 | AMB 0,5 |
| D | 5FC 0,06 | 5FC 0,12 | 5FC 0,25 | 5FC 0,5 | 5FC 1 | 5FC 2 | 5FC 4 | 5FC 8 | 5FC 16 | 5FC 32 | 5FC 64 | AMB 1 |
| E | POS 0,008 | POS 0,015 | POS 0,03 | POS 0,06 | POS 0,12 | POS 0,25 | POS 0,5 | POS 1 | POS 2 | POS 4 | POS 8 | AMB 2 |
| F | VOR 0,008 | VOR 0,015 | VOR 0,03 | VOR 0,06 | VOR 0,12 | VOR 0,25 | VOR 0,5 | VOR 1 | VOR 2 | VOR 4 | VOR 8 | AMB 4 |
| G | ITR 0,015 | ITR 0,03 | ITR 0,06 | ITR 0,12 | ITR 0,25 | ITR 0,5 | ITR 1 | ITR 2 | ITR 4 | ITR 8 | ITR 16 | AMB 8 |
| H | FLC 0,12 | FLC 0,25 | FLC 0,5 | FLC 1 | FLC 2 | FLC 4 | FLC 8 | FLC 16 | FLC 32 | FLC 64 | FLC 128 | FLC 256 |

Abb.9: Sensititre-Yeast-One YO10 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA): Schematische Belegung der 96-Well-Mikrotiterplatte. Darstellung der eingestellten Konzentrationsgradienten für (horizontal): A2-A11 Anidulafungin (in mg/L; Abk.: AND); B1-B11 Micafungin (in mg/L; Abk.: MIF); C1-C11 Caspofungin (in mg/L; Abk.: CAS); D1-D11 5-Fluorocytosin (in mg/L; Abk.: 5-FC); E1-E11 Posaconazol (in mg/L; Abk.: POS); F1-F11 Voriconazol (in mg/L; Abk.: VOR); G1-G11 Itraconazol (in mg/L; Abk.: ITR); H1-H12 Fluconazol (in mg/L; Abk.: FLC); A1 Wachstumskontrolle (WK). Vertikal: 12A-12G Amphotericin B (in mg/L; Abk.: AMB).

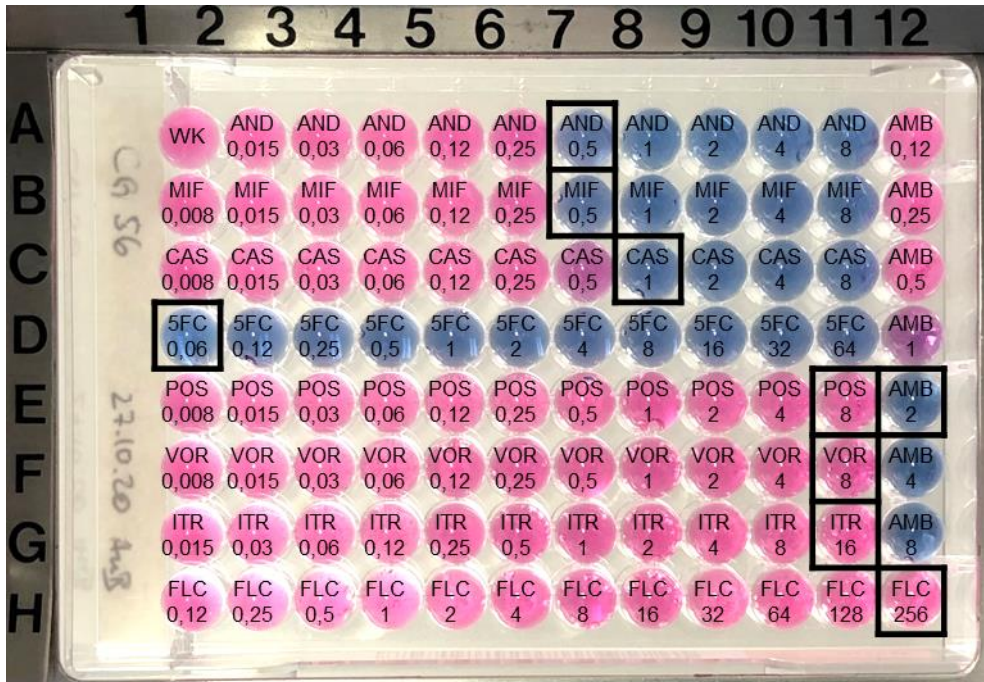


Abb.10: Beispielhafte Auswertung Sensititre-Yeast-One YO10 anhand von *C. glabrata*-Isolat CG56 nach 24 h Inkubation. Gemessene MHK-Werte in schwarzer Umrahmung: **A7)** Anidulafungin: 0,5 mg/L; **B7)** Micafungin: 0,5 mg/L; **C8)** Caspofungin: 1 mg/L; **H12)** Fluconazol: ≥ 256 mg/L; **E12)** Amphotericin B 2mg/L; **D1)** 5-Fluorocytosin: $\leq 0,06$ mg/L; **F11)** Voriconazol: ≥ 8 mg/L; **E11)** Posaconazol ≥ 8 mg/L; **G11)** Itraconazol: ≥ 16 mg/L.

Schematische Belegung der 96-Well-Mikrotiterplatte. Darstellung der eingestellten Konzentrationsgradienten für (horizontal): A2-A11 Anidulafungin (in mg/L; Abk.: AND); B1-B11 Micafungin (in mg/L; Abk.: MIF); C1-C11 Caspofungin (in mg/L; Abk.: CAS); D1-D11 5-Fluorocytosin (in mg/L; Abk.: 5-FC); E1-E11 Posaconazol (in mg/L; Abk.: POS); F1-F11 Voriconazol (in mg/L; Abk.: VOR); G1-G11 Itraconazol (in mg/L; Abk.: ITR); H1-H12 Fluconazol (in mg/L; Abk.: FLC); A1 Wachstumskontrolle (WK). Vertikal: 12A-12G Amphotericin B (in mg/L; Abk.: AMB).

2.1.11 VITEK2 mit AFST-YS08 Resistenzkarte (bioMérieux)

Die AST-YS08 Resistenzkarte für das vollautomatische kommerzielle Testsystem VITEK2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) dient der *in vitro* Empfindlichkeitstestung klinisch relevanter Hefen. Es ist dem Referenzverfahren nach CLSI entlehnt. Diverse Antimykotika, Medien und Reagenzien wurden in die Testkarte implementiert. Das generelle Prinzip kann als automatische, verkürzte und miniaturisierte Version einer Mikrodilution beschrieben werden. Für die Testungen wurde ein Inokulum von 1,8-2,2 McFarland (densiCHEK plus, bioMérieux) in 3 ml 0,45-prozentiger NaCl-Lösung hergestellt und mit der Testkarte in das Inkubator-Karussell gesetzt. Nach kontinuierlicher Wachstumsmessung der einzelnen, auf der Karte eingelassenen Kammern am Ende der Inkubationszeit (individuell unterschiedlich, bis zu 36 h für Hefen), wurden die ermittelten MHK-Werte automatisch im System hinterlegt, interpretiert und ausgedruckt. Abbildung 4 zeigt das VITEK Messsystem. In Tabelle 10 sind diverse Antimykotika und Interpretationsbereiche hinterlegt. Abbildung 11 illustriert einen Befundausdruck.

Tab.10: Interpretationsbereiche und verfügbare Testsubstanzen der AST-YS08 Resistenzkarte für das vollautomatische kommerzielle Testsystem VITEK2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich).

| Antimykotikum | Interpretationsbereich in mg/L | |
|----------------------|---------------------------------------|-----|
| Amphotericin B | ≤0,25 | ≥16 |
| Caspofungin | ≤0,125 | ≥8 |
| Fluconazol | ≤0,5 | ≥64 |
| Flucytosin | ≤1 | ≥64 |
| Micafungin | ≤0,06 | ≥8 |
| Voriconazol | ≤0,12 | ≥8 |

bioMérieux-Kunde: [REDACTED]
 Systemnr.: [REDACTED]

Laborbefund

Gedruckt am 05.11.2020 07:14 CST
 Gedruckt von: LabSuper

Isolat: CG56-1 (Zu prüfen)

Arbeitsplatz: fom

Kartentyp: AST-YS08 Barcode: 2881428103423952 Analysegerät: [REDACTED] (Wuerzburg 2)
 Anwender: ???(superlab)

Keimzahl: **Gewählter Keim: Candida glabrata**

| | |
|--------------------|---|
| Kommentare: | GEMAESS PACKUNGSBEILAGE LIMITIERUNG FÜR FLUCONAZOL,BITTE MIT ALTERNATIVER METHODE BESTÄTIGEN. |
| | |
| | |
| | |

| | |
|---|---|
| Infos zur Identifizierung | |
| Ursprung des Keims | Anwender |
| Gewählter Keim | Candida glabrata |
| | Eingegeben: 04.11.2020 12:34 CST Von: unknown |
| Meldungen zur Analyse: | |
| Folgende Antibiotika werden nicht angegeben: Fluconazol, | |

| | | | | | |
|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--|------------|-----------------------|
| Infos zur Resistenz | Karte: AST-YS08 | Chargenbez: 2881428103 | Verfallsdatum: 24.10.2021 13:00 CDT | | |
| | Beendet: 05.11.2020 01:37 CST | Status: Fertig | Analysen-Dauer: 12,82 Std. | | |
| Antibiotikum | MHK | Interpretation | Antibiotikum | MHK | Interpretation |
| Fluconazol | | | Micafungin | 0,5 | R |
| Voriconazol | <= 0,12 | S | Amphotericin B | 0,5 | IE |
| Caspofungin | 1 | R | Flucytosin | <= 1 | S |

+ = Abgeleitete Antibiotika * = AES modifiziert ** = Anwender modifiziert IE = Unzureichende Evidenz, dass die Spezies ein geeignetes Ziel für Therapie ist; MHK kann ohne Interpretation berichtet werden.

Abb.11: Beispielhafte Befundmitteilung der AST-YS08 Resistenzkarte für das vollautomatische kommerzielle Testsystem VITEK2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) anhand von *C. glabrata*-Isolat CG56.

2.1.12 Etest (bioMérieux)

Der Epsilon-Test (Etest, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) ist ein kommerzielles Verfahren, das auf, mit exponentiell ansteigenden Antimykotikakonzentrationsgradienten versehenen, Teststreifen basiert. Anhand dieses Gradienten, der in das Festmedium diffundiert, waren - nach Inokulation und Inkubation - ellipsoide Hemmhöfe im Heferasen zu erkennen, an deren Randzone der MHK-Wert ermittelt wurde. Als Inokulum fungierte eine Hefesuspension in Aqua dest., die mittels Neubauer improved Zählkammer auf 5×10^6 KBE/ml eingestellt wurde. Diese wurde mit einem sterilen Wattestäbchen auf RPMI-1640 Festmedium (bioMérieux) ausplattiert und 15 min luftgetrocknet. Danach wurde der entsprechende Teststreifen je nach Antimykotikum hinzugefügt und bei 35 °C für 24 h inkubiert (Abb.12).

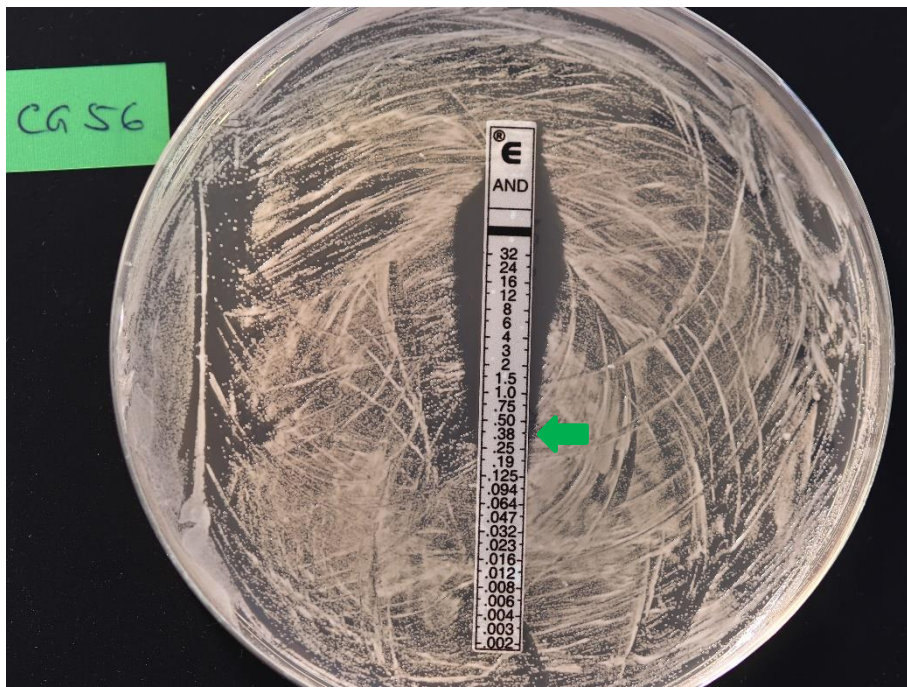


Abb.12: Beispielhafter Anidulafungin-Epsilon-Test (Etest, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) anhand von *C. glabrata*-Isolat CG56. MHK-Wert: 0,38 mg/L (grüner Pfeil).

2.1.13 Breakpoints nach EUCAST und CLSI

Die aktuell für *C. glabrata* gültigen Breakpoints (BP) nach EUCAST und CLSI, welche in dieser Arbeit ihre Anwendung fanden, sind Tabelle 11 zu entnehmen [97, 116].

Tab.11: Aktuell gültige Breakpoints (BP) nach EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) und CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute). Sensibel (-S-); Intermediär / Sensibel bei erhöhter Dosis (-I-); Resistent (-R-).

| Antimykotikum | MHK-Wert in mg/L | | | | |
|---------------|------------------|-------|--------|-------|-------|
| | EUCAST | | CLSI | | |
| | -S- | -R- | -S- | -I- | -R- |
| Anidulafungin | ≤0,06 | >0,06 | ≤0,125 | 0,25 | ≥0,5 |
| Micafungin | ≤0,03 | >0,03 | ≤0,06 | 0,125 | ≥0,25 |
| Caspofungin | i.E. | i.E. | ≤0,125 | 0,25 | ≥0,5 |
| Fluconazol | ≤0.001 | 16 | | | |

2.1.14 Qualitätskontrolle der Testverfahren

Der Referenzstamm ATCC 22019 *C. parapsilosis* diente als Qualitätskontrolle aller in dieser Arbeit ausgeführten Resistenztestungen. Die jeweiligen Kontrollen lagen innerhalb der in Tabelle 12 aufgeführten Spannweiten für MHK-Werte. Diese sind für CLSI validierte Testverfahren dem Dokument „M61“ (https://clsi.org/media/3682/m61ed2_sample.pdf) bzw. für EUCAST validierte Testverfahren dem Dokument „QC for EUCAST antifungal testing, Version 5.0“ (<https://www.eucast.org/astoffungi/qcafsttables/>) zu entnehmen. Beispielhaft sind die Qualitätskontrollen für Yeast One und Micronaut in Tabelle 13 dargestellt.

Tab.12: ATCC 22019 *C. parapsilosis* Qualitätskontrolle: Tolerable Spannweiten für MHK-Werte nach EUCAST (<https://www.eucast.org/astoffungi/qcafsttables/>) und CLSI (https://clsi.org/media/3682/m61ed2_sample.pdf). In Etablierung (i.E.).

| Antimykotikum | MHK-Spannweite in mg/L | |
|---------------|------------------------|--------|
| | EUCAST | CLSI |
| Anidulafungin | 0,25-1 | 0,25-2 |
| Micafungin | 0,5-2 | 0,5-2 |
| Caspofungin | i.E. | 0,25-1 |
| Fluconazol | 0,5-2 | 0,5-4 |

Tab.13: Exemplarische Ergebnisse der Qualitätskontrollen. MHK-Werte für den jeweils mitgeführten Referenzstamm ATCC 22019 *C. parapsilosis* unter Verwendung des Sensititre-Yeast-One YO10 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) (YO) und des MICRONAUT-AM (Merlin Diagnostika- A Bruker Company, Bornheim, Deutschland) (MM).

| Antimykotikum | MHK-Wert in mg/L | |
|---------------|------------------|--------|
| | YO | MM |
| Anidulafungin | 1 | 0,25 |
| Micafungin | 1 | 0,5 |
| Caspofungin | 0,5 | (0,25) |
| Fluconazol | 4 | 2 |

2.1.15 Labor-Ringversuch

Fünf ausgewählte Isolate wurden in einem nationalen Ringversuch verblindet getestet und an 10 teilnehmende mikrobiologische Institute versandt. Die Vorgabe lautete, die Resistenztestung der Isolate mit einer, an dem Institut in der Diagnostik gebräuchlichen, phänotypischen Methode durchzuführen und eine Interpretation der Ergebnisse (MHK-Werte) nach den jeweiligen Standards anzuschließen - genauso wie es für ein ganz normales Routine-Isolat gemacht werden würde. Alle Echinocandine konnten gemessen werden, mussten es jedoch nicht; es sollte für jeden Stamm mindestens Anidulafungin oder Micafungin gemessen werden. Zum Zwecke des Versands wurden die Stämme auf YPD-Festmedien für 24 h bei 35 °C bebrütet, 3-5 Einzelkolonien in 5 ml Aqua dest. suspendiert und anschließend 50 µl dieser Suspension auf YPD-Schrägagar ausgestrichen. Nach einer abermaligen Bebrütung von 24 h bei 35 °C und visueller Wachstumskontrolle wurden die Isolate verschickt.

2.1.16 Statistik

Alle klinischen Daten wurden in anonymisierter Form aus der NRZMyk-Datenbank extrahiert und weiter verblindet, um eine Rückverfolgung und Zuordnung des Patienten*innenguts zu verhindern. Die in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen wurden mit den Programmen GraphPad Prism Version 7.05, Inkscape draw freely 1.0.1 und Microsoft PowerPoint gestaltet und editiert. Die Varianzanalysen von Echinocandin-MHK-Werten und *FKS*-HS-Mutationen wurden mit einem Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparisons test für nichtparametrische Daten in GraphPad Prism Version 7.05 durchgeführt.

2.2 *C. glabrata*-SCV Screening

Im Zuge der Labor-Routine am IHM wurden alle zur Diagnostik von Hefepilzinfektion anfallenden chromogenen Festmedien (CHROMagar, Becton Dickinson, New Jersey, USA) in einem Zeitraum von 8 Monaten systematisch gesammelt und bei 37 °C für zusätzlich mindestens 7 Tage inkubiert. Danach erfolgte eine visuelle Kontrolle bezüglich Wachstumsverhalten, Farbe und Morphologie der Kolonien. Alle verdächtigen, rosa bis mauve imponierenden, langsam wachsenden und morphologisch als „petite“ zu charakterisierenden Kolonien wurden in ihrer Spezies über das Verfahren Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse freigesetzter Ionen zur Massenspektrometrie (kurz: MALDI-TOF MS; BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) identifiziert, um relevante *C. glabrata*-SCV zu separieren (Abb.2).

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung klinischer *C. glabrata* Isolate (2015-2019)

In einem Zeitraum von fünf Jahren wurden insgesamt 178 klinische Isolate der Spezies *Candida glabrata* an das NRZMyk übermittelt. Der primäre Grund hierfür bestand in einer Anfrage des einsendenden Labors bezüglich Überprüfung auffälliger Resistenzmuster durch das Referenzverfahren Mikrodilution nach EUCAST. Zwei dieser Isolate wurden als identische Duplikate von bereits inkludierten Erstisolaten derselben Patientinnen identifiziert und konsekutiv von einer weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Herkunft der restlichen 176 *C. glabrata* Stämme ließ sich von insgesamt 175 Patienten*innen ableiten, da in einem Fall zwei nicht-identische Phänotypen (CG47 und CG48) einer einzigen Patientin entnommen wurden.

Eine Altersverteilung in Fünfjahreskategorien ist Abbildung 13 zu entnehmen. Die Mehrheit der auf diese Weise eingeordneten Patienten*innen (14 %) befand sich - zum Zeitpunkt der Probenentnahme - in der Alterskategorie zwischen 61-65 Jahren. Jeweils 13 % wurden zwischen 66-70 bzw. 71-75 Jahren eingruppiert. Insgesamt waren 81 % (142/175) der Patienten*innen zwischen 46-85 Jahre alt. Die Mehrzahl des untersuchten Patienten*innenklientels gehörte dem männlichen Geschlecht an (männlich 56 % (98/175); weiblich 43 % (76/175); keine Angabe 1 % (1/175)).

Mit 40 % wurden die meisten *C. glabrata*-Isolate aus Blutkulturen angezüchtet, gefolgt von 25 % aus abdominalen Proben und 7 % Anzucht aus Urin. Ebenfalls 7 % wurden aus dem Respirationstrakt isoliert, 4 % waren Fremdkörper assoziierte Infektionen und 13 % konnten einer anderen Lokalisation als den vorherig beschriebenen zugeordnet werden. Für 3 % wurde vom Einsender keine Angabe gemacht (Abb.13).

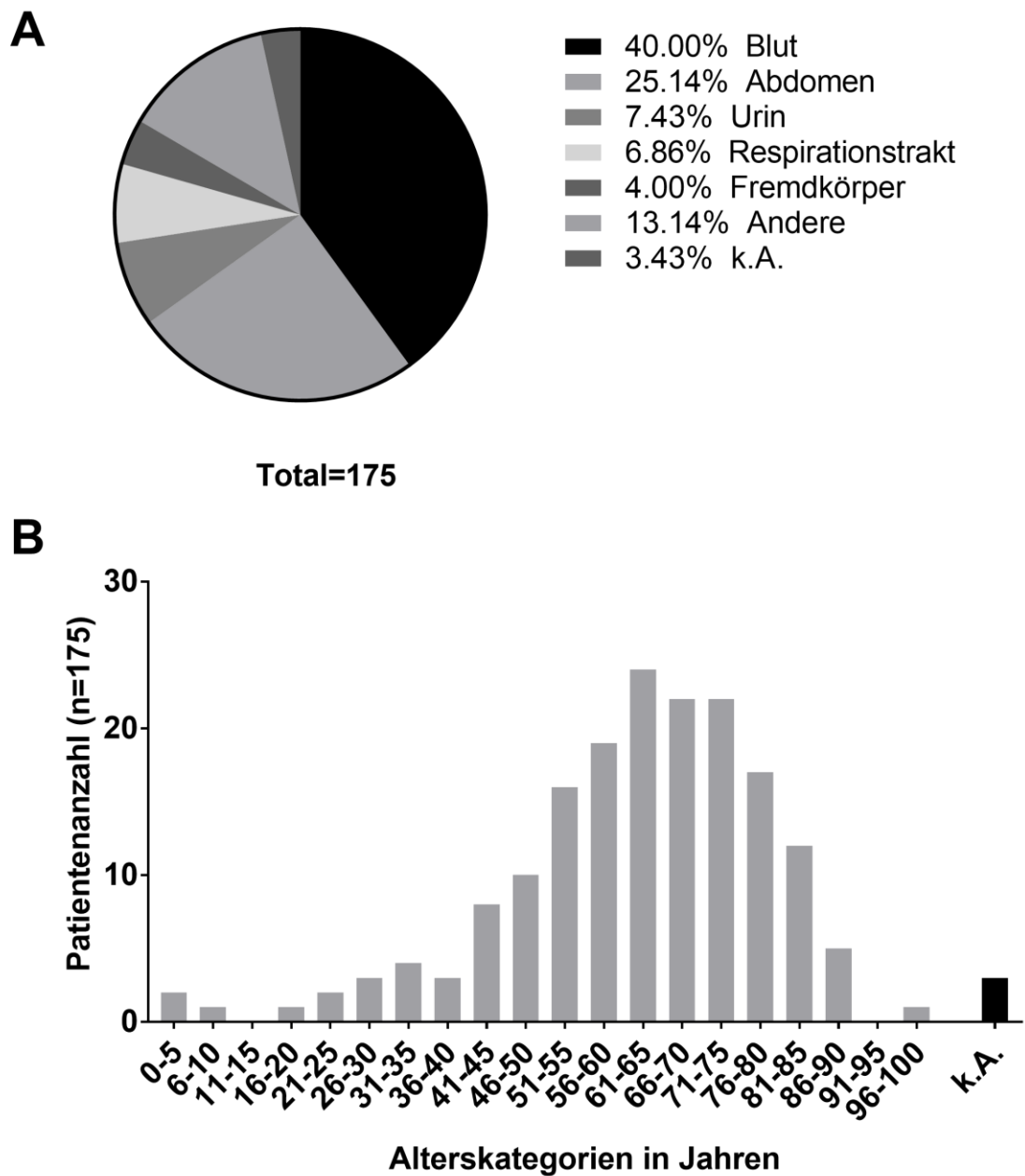


Abb. 13: **A** Prozentuale Verteilung der Proben nach Isolationsort (n=175). Keine Angabe (k. A.). Tortendiagramm. **B** Kategorisierung des Patienten*innenguts (n=175) nach Alter (in 5 Jahresabständen). Keine Angabe (k. A.). Balkendiagramm.

Eine Sequenzierung der *ITS*-Region erlaubte eine eindeutige Speziesidentifikation als *C. glabrata*. Somit konnten die oftmals durch andere Methoden durchgeführten Identifikationen der einsendenden Labore bestätigt werden.

3.1.1 Initiale Echinocandin-Resistenztestungen

Nach Erhalt der klinischen Isolate wurden die Anidulafungin MHK-Werte für alle 176 Stämme durch das Referenzverfahren Mikrodilution nach EUCAST ermittelt. Die auf diese Art erhobenen Werte variieren - wie aus Tabelle 2 ersichtlich - insgesamt in einer Spannweite von $\leq 0,016$ mg/L bis >8 mg/L.

92 Isolate (52 %) wurden gemäß aktuellem EUCAST BP ($\leq 0,06$ mg/L) empfindlich gegenüber Anidulafungin (AND^S) gemessen. 84 Isolate (48 %) konnten hingegen nach EUCAST Interpretation mit MHK-Werten von $>0,06$ mg/L als Anidulafungin resistent (AND^R) eingestuft werden (Abb.14).

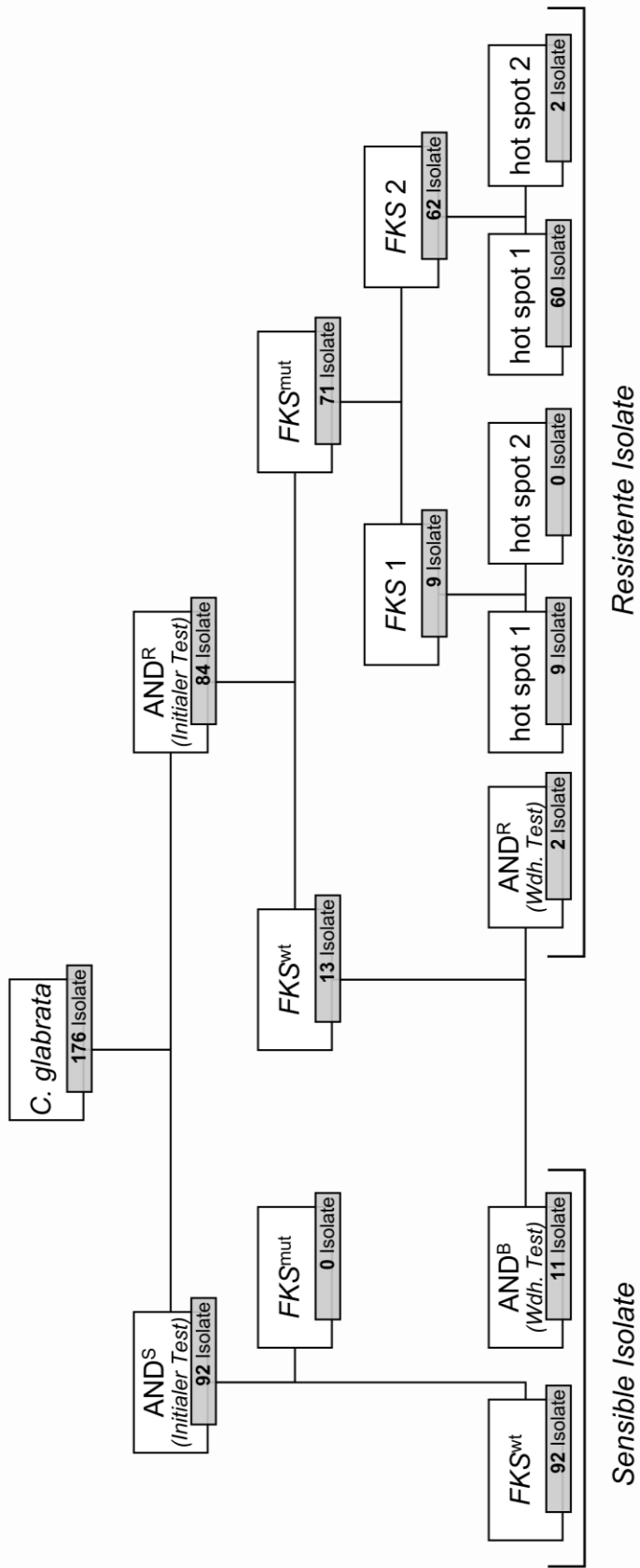


Abb. 14: Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Resistenzanalyse 176 klinischer *C. glabrata* Isolate in Bezug auf das Echinocandin Anidulafungin. Anidulafungin sensibel (AND^S); Anidulafungin resistent (AND^R); Anidulafungin „Borderline“ (AND^B); FKS-Wildtyp (FKS^{wt}); FKS Mutation (FKS^{mut}); Testwiederholung und Ausweitung (Wdh. Test).

3.1.2 *FKS*-Sequenzanalyse

Die HS beider *FKS*-Gene wurden mindestens zweimal in allen 176 Isolaten nach der Sanger-Methode sowohl mit dem Reverse- als auch Forward-Primer sequenziert. Keines der 92 als Anidulafungin sensibel eingestuften Isolate imponierte mit einer Mutation in den bekannten HS-Regionen des *FKS1*- oder *FKS2*-Gens. Sie wurden somit als *FKS*-Wildtyp (*FKS*^{wt}) klassifiziert (Abb.14).

Konträr dazu zeigten 71 von 84 als Anidulafungin resistent (*AND*^R) klassifizierte Isolate einzelne Punktmutationen in einer der HS-Regionen (HS1, HS2) des *FKS1*- oder *FKS2*-Genabschnitts (*FKS*^{mut}; Abb.14). Die Mehrheit dieser *AND*^R/*FKS*^{mut} Isolate (62/71) wies mit 87,3 % eine Mutation in *FKS2* auf, währenddessen in nur 12,7 % (9/71) der Fälle eine *FKS1*-Mutation detektiert werden konnte (Abb.14).

Mutationen, welche in *FKS1* identifiziert wurden, befanden sich ausnahmslos alle im HS1. Ebenfalls zeigte die Mutationsverteilung in *FKS2* eine starke Akzentuierung den HS1 betreffend, in welchem 60 von insgesamt 62 *FKS2*-Mutationen erfasst werden konnten.

Diese 60 Mutationen - alle lokalisiert in *FKS2*-HS1 - wurden auf insgesamt nur fünf divergente Positionen zurückgeführt: Leu-662 (n=2), Asp-666 (n=5), Pro-667 (n=2), Phe-659 (n=29) und Ser-663 (n=22). Eben solche sind bereits bekannt und werden in der Fachliteratur mit Echinocandin-Resistenzen assoziiert [129]. Darüber hinaus betrafen fast dreiviertel aller Mutationen, welche in dieser Arbeit identifiziert wurden, die Positionen Phe-659 und Ser-663 (Abb.15). Andere *FKS*-Mutationen in *AND*^R Stämmen wurden in *FKS1*-HS1 (Position Phe-625 (n=5), Position Ser-629 (n=2), Position Leu-630 (n=1) und Position Asp-632 (n=1)) oder *FKS2*-HS2 (Position Arg-1378 (n=2)) lokalisiert, welche mit nur 15 % (11/71) Gesamtanteil die Minorität darstellten.

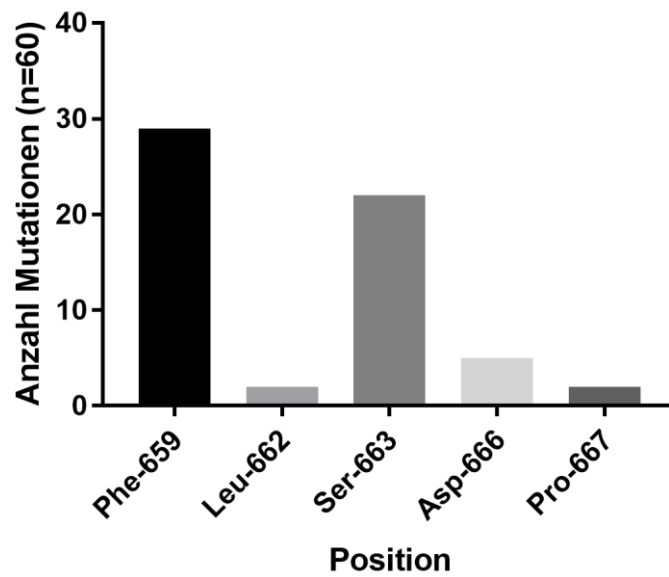


Abb. 14: Distribution der Mutationen nach Positionen des Aminosäureaustauschs innerhalb des Hotspots (HS1 von *FKS2*) mit den meisten veränderten oder deletierten Aminosäuren (n=60). Auf die Positionen Phe-659 (n=28) und Ser-663 (n=22) verteilen sich mit 83 % (50/60) nicht nur die Mehrheit der Mutationen in *FKS2*-HS1, sondern mit 70 % (50/71) ebenfalls die Mehrheit aller Mutationen dieser Studie. Balkendiagramm. Aminosäuren: Asparaginsäure (Asp); Leucin (Leu); Phenylalanin (Phe); Prolin (Pro); Serin (Ser).

3.1.3 Korrelation *FKS*-Mutation und Anidulafungin-MHK

Isolate mit relevanten Mutationen in *FKS2*-HS1 Position 663 (1 x Ser-663→Phe; 1 x Ser-663→Trp; 20 x Ser-663→Pro) imponierten - wie in Abbildung 16 skizziert - im Vergleich zu Mutationen in Positionen Phe-659 und Asp-666 (ebenfalls beide *FKS2*-HS1) mit einer Assoziation zu signifikant höheren Anidulafungin MHK-Werten (p -value $<0,001$). Die häufigste Mutation Ser-663→Pro korreliert mit eher hohen Anidulafungin MHK-Werten, wobei die überwiegende Mehrheit der Isolate, welche diese Mutation aufwiesen, mit MHK-Werten von 2 mg/L (Spannweite: 1-4 mg/L) gemessen wurden (Abb.17).

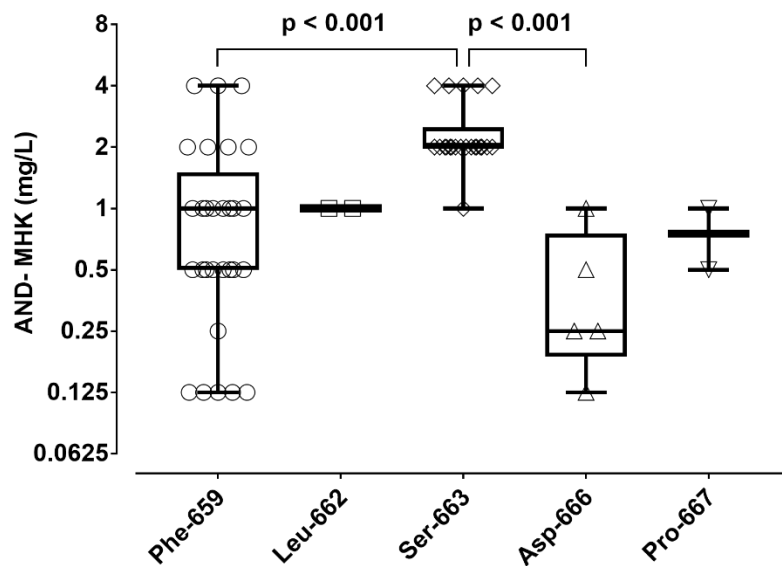


Abb.16: Anidulafungin (AND) MHK-Werte mit Bezug auf die Positionen eines relevanten Aminosäureaustauschs in Fks2 HS1. Es sind signifikante Unterschiede in der Höhe der MHK-Wert Verteilung zwischen Positionen Ser-663 und Phe-659 ($p < 0,001$) sowie Ser-663 und Asp-666 zu erkennen ($p < 0,001$). Boxplots mit Median, unterem- / oberem Quartil und Spannweite der jeweiligen Position. Aminosäuren: Asparaginsäure (Asp); Leucin (Leu); Phenylalanin (Phe); Prolin (Pro); Serin (Ser).

Indes führten Mutationen in Position Phe-659 (*FKS2*-HS1) zu vorwiegend divergenten Phänotypen. Isolate mit einer Deletion in Position Phe-659 zeigten dabei die stärkste Assoziation zu erhöhten Anidulafungin MHK-Werten im Vergleich zu anderen Mutationen innerhalb dieser Position (n=9; Median: 2 mg/L; Spannweite: 0,5-4 mg/L) (Abb.17). Diese (Phe-659→Tyr (n= 6) und Phe- 659→Ser (n=8)) deuteten mit medianen Anidulafungin MHK-Werten von 0,5 mg/L eher auf eine weniger ausgeprägte und moderate MHK-Erhöhung und damit einhergehende geringe Assoziation zu Hochresistenzen hin. Zusätzliche Mutationen, welche die Position Phe-659 tangierten, wurden nur in einer geringen Anzahl von Stämmen identifiziert (3 x Phe-659→Val, 2 x Phe-659→Leu, 1 x Phe-659→Cys). Diese geringe Fallzahl schloss eine weitere statistische Analyse und Assoziation der einzelnen Mutationen in Bezug auf erhöhte Anidulafungin Resistenzwerte aus (Abb.17).

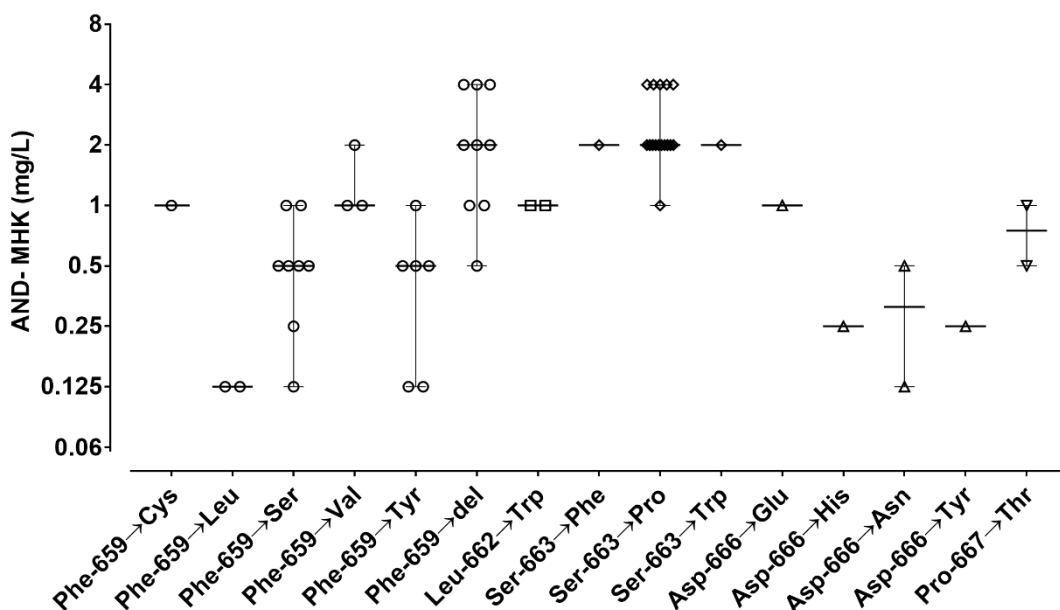


Abb.17: Verteilung der Anidulafungin (AND) MHK-Werte mit Bezug auf diverse einzelne Mutationen mit konsekutivem Aminosäureaustausch oder Deletion (del) innerhalb der Positionen in Fks2 HS1. Streudiagramm mit Spannweite und Median. Aminosäuren: Asparagin (Asn); Asparaginsäure (Asp); Cystein (Cys); Glutaminsäure (Glu); Histidin (His); Leucin (Leu); Phenylalanin (Phe); Prolin (Pro); Serin (Ser); Threonin (Thr); Tryptophan (Trp); Tyrosin (Tyr); Valin (Val).

Ebenso wurden die Positionen Phe-659, Leu-662, Ser-663, Asp-666 und Pro-667 mit der Höhe der entsprechenden Caspofungin MHK-Werte korreliert (Abb.18). Generell konnten die bei Anidulafungin beobachteten Ergebnisse bestätigt und die Assoziation bestimmter Positionen zu erhöhten MHK-Werten und damit einer ausgeprägteren Resistenz untermauert werden. Vor allem die Position Ser-663 zeigte hier erwartete signifikante Unterschiede ($p=0,001$). 30 Isolate wurden mit MHK-Werten >8 mg/l gemessen und lagen am oberen Limit der Messskala.

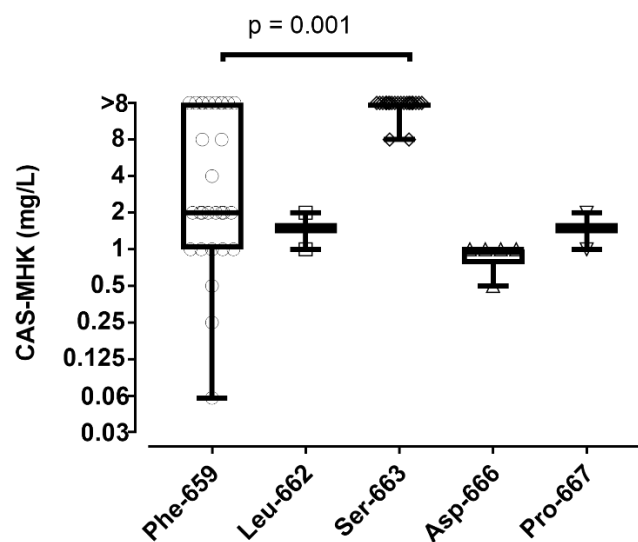


Abb.18: Caspofungin (CAS) MHK-Werte mit Bezug auf die Positionen eines relevanten Aminosäureaustauschs in Fks2 HS1. Es sind signifikante Unterschiede in der Höhe der MHK-Wert Verteilung zwischen Positionen Ser-663 und Phe-659 ($p=0,001$) zu erkennen. Boxplots mit Median, unterem und oberem Quartil sowie Spannweite der jeweiligen Position. Aminosäuren: Asparaginsäure (Asp); Leucin (Leu); Phenylalanin (Phe); Prolin (Pro); Serin (Ser).

3.1.4 Echinocandin-Empfindlichkeit bei AND^R/FKS^{wt} Stämmen

Initial wurden 13 *C. glabrata*-Isolate (7 %) via Referenz Mikrodilution nach EUCAST phänotypisch für AND^R befunden (Abb.14). Eine anschließende Sequenzierung der HS-Regionen konnte jedoch keine konkordanten *FKS*-HS Mutationen bestätigen, sodass diese zunächst als AND^R/FKS^{wt} eingeordnet wurden. Die Anidulafungin MHK-Werte für diese Stämme reichten von 0,125 mg/L (n=7) über 0,25 mg/L (n=3) bis > 0,5 mg/L (n=3) (Tab.14).

Auf Grund der ungewöhnlichen Diskrepanz phänotypischer sowie genotypischer Resistenzmerkmale wurden das Portfolio von Resistenztestungen und Antimykotika (Hinzunahme von Micafungin (MIF)) für diese Isolate erweitert, um zu überprüfen, ob die phänotypische Resistenz dieser Stämme gegenüber Anidulafungin im Speziellen und Echinocandinen im Allgemeinen bestätigt werden konnte (Tab.14). Hierzu wurden kommerzielle Systeme wie der Micronaut-Mikrodilutionstest (MICRONAUT-AM, Merlin Diagnostika - A Bruker Company, Bornheim, Deutschland) (MM), interpretiert nach EUCAST, sowie der Sensititre-Yeast-One YO10 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) (YO) und die AST-YS08 Resistenzkarte für den VITEK2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) (VIT), beide interpretiert nach CLSI, genutzt (Tab.14, Abb.4, 8, 10). Zudem wurden Anidulafungin und Micafungin Eteste (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) durchgeführt (Tab.14, Abb.12).

Tab.14: Erweiterte Resistenztestung unter Verwendung multipler Testsysteme (T.). Inkludiert sind 11 "Borderline" *C. glabrata* Stämme (AND^B/FKS^{wt}) und zwei Anidulafungin resistente Stämme (AND^R/FKS^{wt}). Anidulafungin Referenzmikrodilution nach EUCAST (BM). Die kommerziellen Systeme: Yeast-One (YO), VITEK 2 (VIT), MICRONAUT-AM (MM). Antimykotika: Anidulafungin (AND); Caspofungin (CAS) Micafungin (MIF). Farben entsprechend der Breakpoints von EUCAST oder CLSI (Ref.): rot (resistent); gelb (intermediär); grün (sensibel).

| T. | Minimale Hemm- Konzentrationen (MHK) in mg/L | | | | | | | | | Ref. |
|---|--|--------|-------|--------------|--------|-------|--------------|-------|-------|--------|
| AND^B/FKS^{wt} | | | | | | | | | | |
| | CG150 | | | CG114 | | | CG115 | | | |
| | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | |
| BM | 0.125 | - | - | 0.125 | - | - | 0.125 | - | - | EUCAST |
| MM | 0.031 | 0.016 | 0.125 | 0.031 | 0.016 | 0.125 | 0.031 | 0.016 | 0.125 | EUCAST |
| VIT | - | ≤0.06 | 0.25 | - | ≤0.06 | 0.5 | - | ≤0.06 | 0.5 | CLSI |
| YO | ≤0.015 | 0.015 | 0.06 | 0.015 | 0.015 | 0.06 | ≤0.015 | 0.015 | 0.03 | CLSI |
| ET | 0.032 | 0.012 | - | 0.023 | 0.012 | - | 0.016 | 0.012 | - | - |
| | CG151 | | | CG55 | | | CG113 | | | |
| | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | |
| BM | 0.125 | - | - | 0.125 | - | - | 0.125 | - | - | EUCAST |
| MM | 0.031 | 0.016 | 0.125 | 0.063 | ≤0.002 | 0.25 | 0.25 | 0.016 | 0.25 | EUCAST |
| VIT | - | ≤0.06 | 0.5 | - | ≤0.06 | 0.5 | - | ≤0.06 | 0.5 | CLSI |
| YO | 0.06 | 0.015 | 0.012 | 0.25 | 0.015 | 0.5 | 0.06 | 0.03 | 0.5 | CLSI |
| ET | 0.032 | 0.023 | - | 0.125 | 0.016 | - | 0.064 | 0.047 | - | - |
| | CG116 | | | CG148 | | | CG169 | | | |
| | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | |
| BM | 0.125 | - | - | 0.25 | - | - | 0.25 | - | - | EUCAST |
| MM | 0.125 | 0.016 | 0.125 | 0.125 | 0.016 | 0.125 | 0.125 | 0.016 | 0.125 | EUCAST |
| VIT | - | ≤0.06 | 0.5 | - | ≤0.06 | 0.25 | - | ≤0.06 | 0.25 | CLSI |
| YO | 0.25 | 0.03 | 0.25 | 0.03 | 0.015 | 0.12 | 0.12 | 0.015 | 0.25 | CLSI |
| ET | 0.19 | 0.032 | - | 0.032 | 0.008 | - | 0.032 | 0.012 | - | - |
| | CG83 | | | CG78 | | | | | | |
| | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | | | | |
| BM | 0.25 | - | - | 0.5 | - | - | | | | EUCAST |
| MM | 0.125 | 0.016 | 0.25 | 0.125 | 0.016 | 0.125 | | | | EUCAST |
| VIT | - | ≤0.06 | 0.5 | - | ≤0.06 | 0.5 | | | | CLSI |
| YO | 0.03 | 0.03 | 0.12 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | | | | CLSI |
| ET | 0.047 | 0.016 | - | 0.125 | 0.016 | - | | | | - |
| AND^R/FKS^{wt} | | | | | | | | | | |
| | CG22 | | | CG56 | | | | | | |
| | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | | | | |
| BM | 0.5 | - | - | 2 | - | - | | | | EUCAST |
| MM | 0.25 | ≤0.002 | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.25 | | | | EUCAST |
| VIT | - | ≤0.06 | 0.5 | - | 0.5 | 1 | | | | CLSI |
| YO | 0.5 | 0.03 | 0.12 | 0.5 | 0.5 | 1 | | | | CLSI |
| ET | 0.38 | 0.064 | - | 0.38 | 0.25 | - | | | | - |

Im Ergebnis waren 11 der 13 AND^R/FKS^{wt} Isolate in zwei von drei (n=1; CG78) oder allen drei (n=10) durchgeführten Resistenztestungen empfindlich gegenüber Micafungin (Tab.14). Überdies variierten die Testergebnisse für

Anidulafungin in den zusätzlich durchgeführten Testungen zwischen sensibel und resistent (Tab.14), welches zur Annahme führt, dass die für diese Stämme erhobenen Anidulafungin MHK-Werte um den BP schwanken. Zusätzlich wurden diese Stämme in mindestens einem Test für Caspofungin (Interpretation nur nach CLSI möglich) für intermediär oder resistent befunden. Interessanterweise zeigte sich jedoch - in allen angewandten Testverfahren - keines der Isolate konsistent resistent gegen eines der Echinocandine. Um dieser Problematik Ausdruck zu verleihen, wurden die betreffenden Isolate schlussendlich als „grenzwertig“ (engl. „Borderline“; AND^B) ob der diskrepanten Anidulafungin Testergebnisse klassifiziert (Abb.14; Tab.14).

Zwei der insgesamt 13 AND^R/FKS^{wt} Stämme erwiesen sich in Bezug auf Anidulafungin über alle Testverfahren und Interpretationsarten hinweg als *in toto* resistent. Dies war zutreffend für das Isolat CG22, wodurch die durch die EUCAST-Referenzmethode erzielten Ergebnisse bestätigt werden konnten. Demgegenüber wurde jedoch dasselbe Isolat in allen verwendeten Testmethoden als empfindlich gegenüber Micafungin (MIF^S) getestet, welches dem Dogma der vollständigen Kreuzresistenz innerhalb dieser Antimykotika-Klasse widerspricht (Tab.14). Daraus resultierend wurde das Isolat CG22 als AND^R/MIF^S/FKS^{wt} eingestuft.

Trotz Abwesenheit einer FKS-HS Mutation, wurden konsistent resistente MHK-Werte sowohl gegenüber Anidulafungin als auch gegenüber Micafungin für das Isolat CG56 - in allen angewandten Testverfahren - erhoben, sodass eine Einstufung als AND^R/MIF^R/FKS^{wt} erfolgte (Tab14).

3.1.5 Auswertung Labor-Ringversuch

Um die vorherigen Ergebnisse zu validieren, erfolgte die Durchführung einer verblindeten interinstitutionellen Studie. Der Fokus lag hierbei vor allem auf Stämmen, welche entweder in ihrer Anidulafungin-Resistenz um den BP schwanken, Anidulafungin resistent aber Micafungin sensibel imponieren oder komplette Kreuzresistenzen innerhalb der Echinocandine zeigen, ohne jedoch eine für die Resistenz konkordante Mutation in den HS der *FKS*-Gene aufzuweisen. Somit war von Interesse zu explorieren, wie sich solche Isolate auf die Resistenztestung in der alltäglichen Routinediagnostik einschließlich möglicher klinischer Folgen auswirken. Die *C. glabrata* Stämme CG78 (AND^B/FKS^{wt}), CG22 ($AND^R/MIF^S/FKS^{wt}$) und CG56 ($AND^R/MIF^R/FKS^{wt}$) wurden zum Zwecke der Resistenzüberprüfung an zehn verschiedene mikrobiologische Labore innerhalb eines InfectControl-Sentinel-Labornetzwerks versandt. Als Kontrolle wurden die Isolate CG1 ($AND^S/MIF^S/FKS^{wt}$) und CG27 ($AND^R/MIF^R/FKS^{mut}$; *FKS*-Mutation in *FKS2*-HS1: Ser-663→Pro) inkludiert.

Insgesamt vier verschiedene Testverfahren kamen hier zur Anwendung, sodass 29 MHK-Werte für jeden getesteten Stamm erhoben werden konnten (Tab.15). Die enthaltenen Kontrollen wurden - mit einer Ausnahme - von allen diagnostischen Laboren korrekt getestet und in Analogie zu den Vorergebnissen interpretiert. Als weitere Abweichung ist ein falsch-sensibel gemessener Anidulafungin Etest für das resistente Kontroll-Isolat CG27 anzuführen, welche jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisinterpretation nahm, da das betreffende Labor multiple Testverfahren verwendete (Tab15).

Tab.15: Auswertung Ringversuch. Resistenztestung von *C. glabrata* Isolat CG78 (AND^R/FKS^{wt}), CG22 (AND^R/MIF^S/FKS^{wt}) und CG56 (AND^R/MIF^S/FKS^{wt}). Es wurden der Wildtyp-Stamm CG1 (AND^S/FKS^{wt}) sowie Isolat CG27 mit FKS-Mutation in FKS2 HS1: Ser-663→Pro (AND^R/FKS^{mut}) als Kontrollen mitgeführt. 10 deutsche Labore nahmen verbindlich teil (Lab. 1-10). Testsysteme: MICRONAUT-AM (MM), Yeast-One (YO), VITEK 2 (VIT), E-Test (ET). Antimykotika: Anidulafungin (AND); Caspofungin (CAS); Micafungin (MIF). Farben entsprechend der Breakpoints von EUCAST oder CLSI: rot (resistent); gelb (intermediär/ sensibel bei erhöhter Dosis); grün (sensibel). Interpretation der mit* (Stern) gekennzeichneten CAS-MHK-Werte sind entsprechend EUCAST Vorgabe von AND und/ oder MIF abgeleitet.

| Lab. | Test | Minimale Hemm- Konzentration (MHK) in mg/L | | | | | | | | | | | | | | | | | | Ref. | | |
|------|-----------|--|-------|--------|-------|-------|--------|-------------------------------------|-------|-------------|--------|----------|-------|-----------------|---------|----------|-------|-------------|-------|-------|-------|--------|
| | | AND ^R /FKS ^{wt} | | | | | | AND ^R /FKS ^{wt} | | | | | | Kontroll-Stämme | | | | | | | | |
| | | CG78 | | CG22 | | CG56 | | CG1 (wt) | | CG27(S663P) | | CG1 (wt) | | CG27(S663P) | | CG1 (wt) | | CG27(S663P) | | | | |
| AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | AND | MIF | CAS | | |
| 1 | MM | 0.06 | 0.015 | 0.125* | 0.125 | 0.015 | 0.125* | 0.06 | 0.25* | 0.125 | 0.06 | 0.25* | 0.03 | 0.015 | 0.06* | 0.5 | 0.25 | 0.25* | 0.5 | 0.25 | 0.25* | EUCAST |
| | Befundung | S | - | S* | R | - | R* | - | R* | - | - | R* | S | - | S* | R | - | R* | R | - | R* | EUCAST |
| 2 | ET | 0.047 | - | - | 0.064 | - | - | - | 0.19 | - | - | - | 0.012 | - | - | - | - | - | 4 | - | - | EUCAST |
| | Befundung | S | - | - | S | - | - | R | R | - | - | - | S | - | - | - | - | R | R | - | - | EUCAST |
| 3 | VIT | - | ≤0.06 | 0.5 | 0.064 | - | 0.5 | 0.25 | 0.094 | - | 0.5 | 0.25 | 0.006 | ≤0.06 | 0.5 | - | ≤0.06 | 0.5 | - | ≤0.06 | 0.5 | EUCAST |
| | Befundung | S | - | - | S | - | - | R | R | - | - | - | S | - | - | - | - | S | S | - | - | EUCAST |
| 4 | MM | 0.06 | 0.016 | 0.125 | 0.125 | 0.016 | 0.125 | 0.25 | 0.125 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.016 | 0.06 | 0.06 | 1 | 0.5 | 0.06 | 1 | 0.5 | 8 | EUCAST |
| | Befundung | S | - | - | 0.047 | - | - | R | R | - | - | 0.016 | - | - | - | R | - | - | R | - | - | EUCAST |
| 5 | YO | 0.12 | 0.015 | 0.12 | 0.5 | 0.03 | 0.25 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.06 | 0.03 | 0.12 | 0.12 | 2 | 0.5 | 0.12 | 2 | 0.5 | 0.5 | CLSI |
| | Befundung | S | S | S | R | S | I | R | R | R | R | S | S | S | S | R | R | S | R | R | R | EUCAST |
| 6 | ET | 0.032 | 0.016 | 0.25* | 0.125 | 0.032 | 0.38* | 0.25 | 0.35 | 0.38* | 0.35 | 0.012 | 0.016 | 0.125* | 0.125* | 0.125 | 0.19 | 0.125* | 0.125 | 0.19 | 0.5* | EUCAST |
| | Befundung | - | - | S* | - | - | R* | - | - | R* | - | - | - | S | - | - | - | S | - | - | R* | EUCAST |
| 7 | ET | 0.03 | 0.016 | - | 0.03 | 0.03 | - | 0.03 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.016 | 0.03 | - | - | 8 | 8 | - | 8 | 8 | - | EUCAST |
| | Befundung | S | S | - | S | S | - | S | R | R | R | S | S | - | - | R | R | - | R | R | - | EUCAST |
| 8 | VIT | - | ≤0.06 | 0.25 | - | ≤0.06 | 0.25 | - | 0.5 | 1* | 0.5 | - | ≤0.06 | 0.12 | 0.12 | - | ≤0.06 | 0.12 | - | ≤0.06 | 0.25 | EUCAST |
| | Befundung | 0.0625 | 0.015 | 0.125* | 0.125 | 0.015 | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.25* | 0.0625 | 0.031 | 0.015 | 0.0625* | 0.0625* | 1 | 0.25 | 0.0625* | 1 | 0.25 | 4* | EUCAST |
| | Befundung | 0.064 | - | - | 0.094 | - | - | 0.125 | 0.125 | - | - | 0.012 | - | - | - | 0.064 | - | - | 0.064 | - | - | EUCAST |
| | Befundung | S | S | S* | R | S | - | R | R | R* | R | S | S | S* | R | R | R | S | R | R | R* | EUCAST |
| 9 | MM | 0.06 | 0.02 | -* | 0.125 | 0.02 | - | 0.25 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.02 | 0.02 | -* | - | 0.25 | 0.06 | - | 0.25 | 0.06 | 0.06 | EUCAST |
| | Befundung | S | S | S* | R | S | - | R | R | R | R | S | S | S* | R | R | R | S | R | R | R | EUCAST |
| 10 | ET | 0.06 | 0.012 | - | 0.25 | 0.125 | - | 0.5 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.032 | 0.023 | - | 4 | 2 | - | - | 4 | 2 | - | EUCAST |
| | Befundung | S | S | - | R | R | - | R | R | R | R | S | S | - | R | R | R | - | R | R | R | EUCAST |

Das „Borderline“-Isolat CG78 wurde durchweg von allen partizipierenden Laboren als Echinocandin sensibel eingestuft, was erkennen lässt, dass der im Vorhinein vermutete und detektierte Borderline-Phänotyp nicht in einem relevanten Anteil der Routinetestverfahren diskriminiert werden konnte (Tab.15).

Das als Anidulafungin resistent gewertete Isolat CG22 wurde von sechs auswärtigen Laboren in der Resistenz bestätigt, währenddessen drei Labore es als Anidulafungin sensibel interpretierten. Darüber hinaus sind zwei divergente Anidulafungin Messergebnisse, ausgeführt mit zwei unterschiedlichen Testverfahren in dem gleichen Labor, zu nennen. Unisono zu den vorherig in dieser Arbeit erhobenen Micafungin MHK-Werten bewerteten neun Labore diesen Stamm als sensibel. Lediglich ein Labor stufte ebendiesen als Micafungin resistent ein (Tab.15).

Das als $AND^R/MIF^R/FKS^{wt}$ klassifizierte Isolat CG56 zeigte, trotz Abwesenheit einer relevanten Mutation in den HS-Regionen des *FKS*-Gens, mit Ausnahme eines einzig als sensibel gewerteten E-Tests (Anidulafungin), in allen auswärtigen Laboren eine phänotypisch verminderte Empfindlichkeit gegenüber allen in diesem Ringversuch eingesetzten Echinocandinen (Tab.15).

3.1.6 Fluconazol- und Multidrug-Resistenzen (MDR)

Ebenfalls wurden alle 176 Isolate auf Azol-Resistenzen überprüft. Zur Bestimmung diente die Fluconazol Referenzmikrodilution nach EUCAST. Die Verteilung der Fluconazol MHK-Werte umfing eine Spannweite von 0,25 mg/L bis >64 mg/L (Median 4 mg/L). Übertragen auf die aktuell gültigen EUCAST BP zeigten sich 38 % (n=67) aller Stämme resistent gegen Fluconazol mit MHK-Werten von ≥ 32 mg/L (Tab.2).

Von diesen imponierten 26 Isolate (14 % aller inkludierten Stämme) mit einer Kombination aus Fluconazol- und phänotypischer sowie genotypischer Echinocandin-Resistenz.

Das Verteilungsmuster der für diese Stämme erhobenen *FKS*-Mutationen war insgesamt als ähnlich im Vergleich zu allen AND^R Isolaten zu bewerten. So wurde bei 23 Stämmen eine *Fks2*-HS1 Mutation identifiziert (11x Position Phe-659; 7x Position Ser-663; 4x Position Asp-666; 1x Position Pro-667), während bei drei Isolaten eine *Fks1*-HS1 Mutation (2x Position Phe-625; 1x Position Ser-629) bestätigt wurde (Tab.2).

Innerhalb dieser Gruppe multiresistenter *C. glabrata*-Stämme standen neun Isolate (jeweils drei aus 2016, 2017 und 2018) im Zusammenhang mit akuten Blutstrominfektionen (Tab.16). Drei von diesen (CG20, CG16 und CG58) zeigten hohe Echinocandin und Fluconazol MHK-Werte am oberen Ende der Testskala (Anidulafungin 2-4 mg/L; Caspofungin >8 mg/L; Fluconazol >64 mg/L). Ebenfalls konnte bei diesen hoch resistenten Isolaten eine Ser-663→Pro Mutation nachgewiesen werden (Tab.16).

Die retrospektiv durchgeführte Analyse verfügbarer klinischer Daten zeigte, dass das Isolat CG20 von einer Patientin mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und einer Graft-versus-Host Reaktion der Haut sowie des Gastrointestinaltrakts nach Transplantation bei dreifacher immunsuppressiver Therapie gewonnen wurde. Die antimykotische Therapie wurde zunächst von Voriconazol (VOR) auf Caspofungin eskaliert. Bei weiterer klinischer Verschlechterung im Sinne eines

Multiorganversagens wurde eine Kombination aus Anidulafungin und Amphotericin B appliziert (Tab.16).

Das Isolat CG16 entstammte einer Patientin mit Leberzirrhose äthyltoxischer Genese einhergehender Laktatazidose sowie akuter Pneumonie. Hier fand eine Eskalation der Behandlung von Anidulafungin auf Amphotericin B statt (Tab.16).

Der Stamm CG58 wurde von einem Patienten mit akutem Leberversagen bei Infektion eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts (TIPS) isoliert. Die Komplikation in Form einer akuten *Candida*-Blutstrominfektion wurde mittels 5-Fluorocytosin und Caspofungin therapiert (Tab.16).

Diese drei Patienten*innen (3/9) verstarben an der durch die Stämme CG20, CG16 und CG58 induzierten, schweren Infektion. Fünf Patienten*innen (5/9), bei welchen eine Blutstrominfektion mit MDR *C. glabrata* diagnostiziert wurden, überlebten die Episode. In einem Fall (1/9) konnten retrospektiv keine Outcome-Daten erhoben werden und der Verlauf der Infektion verblieb somit im Ungewissen (Tab.16).

Tab.16: Retrospektiv erhobene klinische Daten von neun ausgewählten MDR *C. glabrata*- Stämmen, welche in Zusammenhang mit Blutstrominfektionen (BSI) asserviert wurden. Abkürzungen: Akute Myeloische Leukämie (AML); Alcohol-related liver disease (ARLD); Amphotericin B (AMB); Anidulafungin (AND); Antifungale Therapie (Antif. Thx); Blutkultur (BK); Caspofungin (CAS); Fluconazol (FLU); 5-Fluorocytosin (5-FC); Geschlecht (Gesch.); Graft versus Host Disease (GvHD); Left ventricular assist device (LVAD); Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt (TIPS); Voriconazol (VRC).

| NRZ-ID | Ge-sch. | Alter | Probe | AND (mg/L) | CAS (mg/L) | FLC (mg/L) | Mutation | Vorerkrankung | Diagnose | Antif. Thx. | BSI Outcome |
|----------|---------|-------|-------|------------|------------|------------|------------------------|----------------------|-------------|-------------------|-------------|
| CG20 | w | 46-50 | BK | 4 | >8 | >64 | Ser-663→Pro (FKS2 HS1) | AML | GvHD | VRC, CAS, AND&AMB | verstorben |
| CG16 | w | 61-65 | BK | 4 | >8 | >64 | Ser-663→Pro (FKS2 HS1) | ALRD, LZ | Pneumonie | AND, AMB | verstorben |
| CG6 | m | 76-80 | BK | 0,5 | 2 | >64 | Phe-659→Ser (FKS2 HS1) | - | - | - | überlebt |
| CG53 | w | 46-50 | BK | 2 | >8 | 32 | Phe-659→del (FKS2 HS1) | BC | Sepsis | CAS | überlebt |
| CG58 | m | 51-55 | BK | 2 | >8 | >64 | Ser-663→Pro (FKS2 HS1) | ALV | TIPS-Infekt | CAS&5FC | verstorben |
| CG164 | m | 76-80 | BK | 0,125 | 0.5 | >64 | Asp-666→Asn (FKS2 HS1) | - | - | FLC | überlebt |
| CG73 | m | 46-50 | BK | 1 | 8 | >64 | Phe-625→Cys (FKS1 HS1) | Aspirationspneumonie | Portinfekt | FLC, CAS | überlebt |
| CG152 | m | 56-60 | BK | 0,5 | 2 | 64 | Pro-667→Thr (FKS2 HS1) | CHV | LVAD-Infekt | CAS | überlebt |
| 2019-615 | m | 76-80 | BK | 1 | >8 | 32 | Phe-659→del (FKS2 HS1) | - | - | - | - |

3.2 Häufigkeit von *C. glabrata*-SCV in Würzburg

Zur Bestimmung der Häufigkeit von klinisch relevanten *C. glabrata*-SCV in der mikrobiologischen Routinediagnostik wurde das unter 2.2 beschriebene Protokoll am Institut für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg (IHM) implementiert. Eingeschlossen wurden u. a. das Varia-, Urin- und Blutkulturlabor, bei welchen naturgemäß eine hohe Ausbeute relevanter Hefepilz-Isolate zu antizipieren war.

466 von insgesamt 3756 in der Routinediagnostik gesammelten Chromagar-Platten (CHROMagar, Becton Dickinson, New Jersey, USA) zeigten Wachstum nach Inkubation. Anhand des unterschiedlichen Farbmusters konnten 525 unterschiedliche Isolate auf diesen Platten identifiziert werden, von denen 312 mit grüner Farbe als *Candida albicans* eingestuft wurden.

170 Isolate imponierten mit einer Farbgebung von rosa bis mauve, sodass, durch Speziesidentifizierung mittels MALDI-TOF (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich), in 82 Fällen die vermutete Spezies *C. glabrata* bestätigt werden konnte. Von den 82 *C. glabrata*-Stämmen wurden anhand der Koloniegröße bei 41 small colonies vermutet, was sich in 20 Fällen nach nochmaliger Wachstumskontrolle bestätigte. Diese 20 Isolate konnten schließlich acht Patienten*innen zugeordnet werden. Abbildung 19 illustriert das Wachstumsmuster von *C. glabrata* „Small Colony Variants“ nach mindestens 7-tägiger Inkubation bei 37 °C.

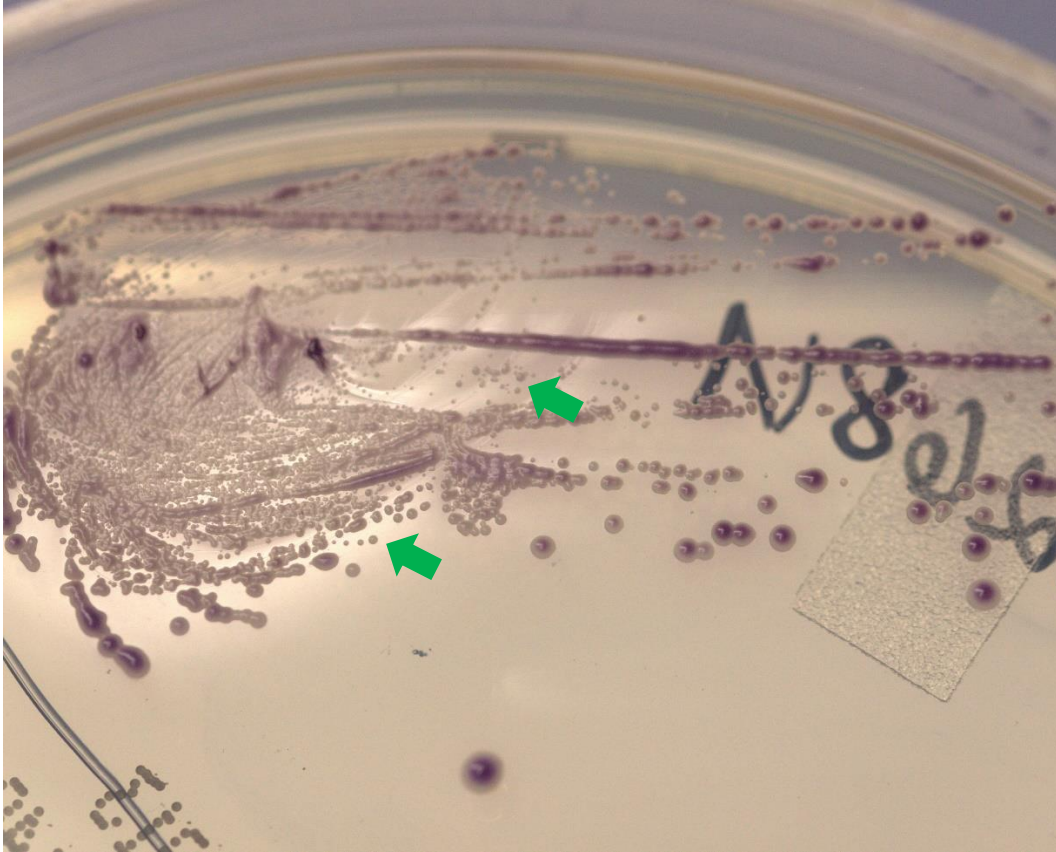


Abb.19: Beispielhafte Darstellung von *C. glabrata*- „Small Colony Variants“. Wachstum auf CHROMagar (Becton Dickinson, New Jersey; USA). Die Kolonien imponieren rosa-mauve auf chromogenem Medium. Die Koloniegröße ist mit 0,5-1 mm deutlich verkleinert (grüner Pfeil).

4 Diskussion

Resistenzen gegen Antimykotika nehmen zu und limitieren zusätzlich die seltenen therapeutischen Optionen in der Behandlung lebensbedrohlich invasiver Pilzinfektionen.

Neue, hochresistente pathogene *Candida* Spezies, wie etwa *Candida auris*, treten vermehrt in Erscheinung und gewinnen global an Bedeutung [20]. *C. auris*, 2009 in Japan offiziell erstbeschrieben und nach dem anatomischen Ort der Primärisolation benannt (auris lat. für Ohr) [130], konnte sich innerhalb weniger Jahre auf fünf Kontinenten als Kolonisierer und somit ebenfalls als Pathogen kritisch kranker und / oder immunsupprimierter Intensiv-Patienten*innen etablieren. Die bisherigen Ausbruchsgeschehen u. a. in Asien (Süd Korea, Indien, Pakistan) [131], dem Nahen Osten (Kuwait, Israel, Oman) [132, 133], Afrika (Südafrika, Tansania) [134], Amerika (Kolumbien, Venezuela, USA, Kanada) [135-137] und in Europa (Deutschland, Spanien, UK, Norwegen) [138-140] illustrieren die zunehmende Ausbreitung dieses Hefepilzes [135, 141]. In Analogie können im Rahmen von Ganz-Genomanalysen und SNP-Interpretationen (single nucleotids polymorphism) vier (Süd- und Ostasiatische, Südafrikanische und Südamerikanische) verschiedene „Clades“ unterschieden werden, wovon allein in Deutschland bisher zwei identifiziert wurden [140]. *C. auris* weist ein ungewöhnlich ausgeprägtes Resistenzprofil auf, bei welchem Resistenzen gegen drei Antimykotika-Klassen keine Seltenheit zu sein scheinen [141-143]. Zudem gilt die Hefe als Verursacher nosokomialer Ausbruchsgeschehen [20].

Neben dem neuen Auftreten von *C. auris* nehmen auch resistente Phänotypen bekannter Pilz-Pathogene zu [144-146]. Während im Zeitraum vor Ende der 1990iger Jahre Azol-Resistenzen bei dem Fadenpilz *Aspergillus fumigatus* (u. a. Auslöser der invasiven Aspergillose mit ~300.000 Fällen pro Jahr weltweit [147], Auslöser des Aspergilloms und der Allergischen Bronchio-Pulmonalen Aspergillose) gänzlich unbekannt waren [148], nehmen verminderte Empfindlichkeiten gegenüber der Erstlinientherapie bis heute weltweit an

Relevanz und Ausmaß zu [149]. So stieg allein in den Niederlanden die Prävalenz Azol-resistenter Isolate von 4,3-13,3 % in 2014 auf 6,7-16,3 % in 2015 [144, 150]. Weiterhin imponieren sowohl in Deutschland als auch in den Niederlanden veröffentlichte Fallstudien invasiver Aspergilloser Azol-resistenter Stämme mit einer Sterblichkeit (*case fatality rate*) von bis zu 90 % [151, 152], was die potenzielle Schwere dieser opportunistischen Infektion zu unterstreichen vermag. Neben einer erworbenen Resistenz unter Azol-Therapie [153], steht der zunehmende Eintrag landwirtschaftlicher Fungizide zur Vernichtung von Schädlingen wie u. a. *Fusarium*- und *Mycosphaerella* Spezies als mögliche Ursache in der Diskussion, akzidentiell die Resistenzentwicklung des ubiquitär vorkommenden *A. fumigatus* zu beschleunigen [154]. Auf deutschen Äckern betrug die Frequenz Azol-resistenter *A. fumigatus* Isolate indes zwischen 2016 und 2018 gerade einmal 1-3 %, sodass sich diese Hypothese für Deutschland in einer aktuell veröffentlichten Surveillance-Studie von Barber *et al.* jedenfalls nicht bestätigen lässt [155].

Bei Hefepilzen sind Azol-Resistenzen u. a. Spezies-abhängig, jedoch, im eigentlichen Mechanismus, häufig variabel [146]. Während *C. albicans* in fast 99 % der Fälle empfindlich auf Fluconazol oder Voriconazol reagiert [156], kann bei *C. glabrata* ein ausgeprägtes und lange bekanntes Resistenzprofil gegenüber Azol-Therapeutika (v. a. Fluconazol) verzeichnet werden [1, 157]. Daneben galten relativ bald nach Einführung im Jahre 2002 die nebenwirkungsärmeren Echinocandine als Goldstandard und Erstlinientherapie zur Behandlung von Candidämien, was einen weltweit verbreiteten Einsatz nach sich zog [24, 158, 159] (Abb.2), obwohl mittlerweile in einer randomisierten Studie die i. v. Applikation von Fluconazol in der Therapie von durch *Candida* Spezies ausgelöster Blutstrominfektionen als zumindest gleichwertig eingestuft wird [1, 81]. Dieser Trend begünstigt die Entwicklung und Selektion resistenter Subpopulationen. Bereits von 2008 / 2009 bis 2012 / 2013 wurde in Dänemark ein Anstieg Echinocandin-resistenter *C. glabrata*-Blutstromisolate von 0,9 auf 3,1 % verzeichnet, in den USA stieg der Anteil resistenter Stämme sogar von 4,9 % (2001) auf 12,3 % (2010) [111]. Für Deutschland liegen aktuell keine Daten vor [1].

Als Ursache dieser erhöhten Toleranz und akzelerierten Resistenzentwicklung ist u. a. das haploide Genom von *C. glabrata* zu nennen. Die damit einhergehende genomische Plastizität ist einer erhöhten Mutationsrate förderlich, sodass Mutationen innerhalb der HS des *FKS*-Gens unter Therapie in höherer Frequenz auftreten und letztendlich Therapieversagen induzieren [114]. Zudem wird diskutiert, dass dieser Effekt durch Veränderungen innerhalb des DNA-Mismatch-Reparatur-Gens abermals verstärkt werden kann und somit zur Ausprägung von sogenannten „Mutator-Phänotypen“ beiträgt [51, 96].

Um diese Surveillance-Lücke zu schließen, wurden in der vorliegenden Arbeit Resistenzen bei klinischen *C. glabrata*-Isolaten aus Deutschland analysiert. Das Hauptaugenmerk lag auf Echinocandin-, Fluconazol- und auf Multi-Resistenzen samt möglicher mechanistischer Hintergründe, auf verschiedene Methoden der Resistenztestung, deren Problematiken und dem nationalen Vergleich ebendieser aber auch auf dem klinischen Outcome ausgewählter besonders pathogener Isolate. Ferner galt es, Paradigmen wie z. B. das der Kreuzresistenzen innerhalb der Substanzklasse der Echinocandine kritisch zu prüfen und zu diskutieren aber auch neue, evtl. abweichende Phänotypen ohne bekannte Mutation im *FKS*-Gen zu identifizieren und zu untersuchen.

4.1 Genotypische vs. phänotypische Echinocandin-Resistenztestung

4.1.1 Genotypische Resistenztestungen und Mutationsanalyse

Die Daten dieser Arbeit belegen, dass Mutationen innerhalb der HS der *FKS*-Gene auch in Deutschland regelmäßig zu finden sind (Abb.14). Ferner werden Ergebnisse früherer Studien im internationalen Vergleich validiert, welche darauf hinweisen, dass vor allem Mutationen im HS1 beider *FKS*-Gene im Zusammenhang mit Echinocandin-Resistenzen auftreten [126, 157, 160]. So wurden in einer groß angelegten multizentrischen US-amerikanischen Studie zwischen 2008 und 2013 insgesamt 1380 *C. glabrata* Blutstromisolate zusammengetragen und einer systematischen Analyse u. a. in Hinblick auf *FKS*-HS Mutationen unterzogen [157]. In 50 Fällen konnte eine solche Mutation bestätigt werden, davon 15 in *FKS1*-HS1 und 35 in *FKS2*-HS1, jedoch keine einzige in *FKS1*-HS2 oder aber *FKS2*-HS2. Die Daten von Castanheira *et al.* als auch Alexander *et al.* unterstreichen ebenfalls die Bedeutung von HS1 beider *FKS*-Gene als zentralen und präferierten Locus einer Echinocandin-Resistenz vermittelnden Mutation, da in beiden Studien zusammen bei insgesamt 54 *FKS*-HS mutierten klinischen *C. glabrata* Isolaten nur in drei Fällen eine Mutation in HS2 des entsprechenden *FKS*-Gens detektiert werden konnte [54, 111]. Die Plausibilität dieser Hypothese wird durch die hier erhobenen Ergebnisse mit einem Nachweis von fast 97 % (69/71) aller relevanten Mutationen innerhalb der Regionen des HS1 beider *FKS*-Gene affirmiert (Abb.14).

Auf Grundlage der besonderen Mutationsverteilung haben Zhao *et al.* einen experimentellen Schnelltest entwickelt, welcher in einer Auswahl die relevantesten Mutationen der HS1 beider *FKS*-Gene einschließlich Wildtyp abdeckt: 7x *FKS1*-HS1 mit Ser-629→Pro, Phe-625→Ser, Asp-632→Tyr, Asp-632→Glu [T1896G], Asp-632→Glu [T1896A], Ile-634→Val und Phe-625→Phe (silent) als auch 6x *FKS2*-HS1 mit Phe-659→del, Phe-659→Ser, Phe-659→Val, Phe-659→Leu, Ser-663→Pro und Ser-663→Phe [126]. Als Verfahren wurde eine Genotypisierung mittels PCR und Molecular Beacon Sonde basierter

Schmelzkurven-Analyse etabliert. Die Divergenz der erhobenen Schmelzkurvenprofile macht eine problemlose Zuordnung der verschiedenen Phänotypen möglich. Einzig die Kurvenanalyse zur endgültigen Unterscheidung von Asp-632→Glu [T1896A] und Phe-625→Phe (silent) zieht einen weiteren Untersuchungsgang mit Phe-625→Phe spezifischer Sonde nach sich [126]. In der sich anschließenden verblindeten Validation mit 186 klinischen *C. glabrata* Stämmen ist eine 100-prozentige Spezifität und 100-prozentige Sensitivität in der Wildtyp / Nicht-Wildtyp Diskrimination erzielt worden [126]. Auf die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse übertragen wären so 69 % (49/71) aller detektierten Mutationen zumeist innerhalb eines Zeitraums von nur drei Stunden erkannt worden. Die Vorteile der Methode, im Vergleich zu einer herkömmlichen, arbeits- und zeitintensiven *FKS*-HS Sequenzierung (wie unter 2.1.7 beschrieben), welche in der Regel im normalen Laboralltag mindestens 48 h meist sogar 72 h in Anspruch nimmt, sind enorm.

In Bezug auf andere Pilz Spezies, wie z. B. dem eingangs erwähnten Fadenpilz *A. fumigatus*, sind molekulare Testverfahren zur Erfassung von Azol-Resistenzen bereits wesentlich ausgereifter und etablierter in der klinischen Diagnostik [161, 162]. So ist es u. a. mittels AsperGENIUS (Patho/Vostics) Multiplex-PCR in 70-100 % der Fälle möglich, einen Direktnachweis von Azol-resistenten *A. fumigatus* aus Atemwegsmaterial zu erzielen ohne eine mehrtägige Inkubation (bis zu sieben Tage) in Kauf nehmen zu müssen [161]. Die Zeitspanne bis zu einem PCR-Ergebnis liegt dabei unter drei Stunden und hat somit direkte Auswirkung auf die Therapieentscheidung bzw. auf eine adäquate Anpassung ebendieser.

Sicherlich ist es notwendig und wünschenswert, die ersten Versuche molekularer Schnelltests zur Früherkennung Echinocandin-resistenter *C. glabrata* Infektionen - ähnlich derer für Azol-resistente *A. fumigatus* Isolate - weiter zu forcieren, um ebenfalls unmittelbar therapeutische Entscheidungen zu beeinflussen oder gar eine Point-of-Care Diagnostik zu entwickeln, jedoch ist an der Stelle die Limitation zu beachten, dass mit diesen Verfahren allein ggf. nicht alle möglicherweise relevanten Mutationen und Resistenzen erfasst werden können.

Eine tiefergehende Analyse der hier erhobenen Mutationsdaten verdeutlicht, dass bei 71 % (51/71) der resistenten Stämme, welche ein innerhalb der HS mutiertes *FKS*-Gen aufweisen, der Aminosäureaustausch an den Positionen Phe-659 und Ser-663 (beide *FKS1*-HS2) am häufigsten in Deutschland zu beobachten ist (Abb.14, 15). Auf Mutationsebene sind insbesondere die Mutationen Ser-663→Pro und Phe-659→del mit den ausgeprägtesten Echinocandin-Resistenzen assoziiert, sodass - als Konklusion der diskutierten Ergebnisse - diese von besonderer Relevanz zu sein scheinen (Abb.17). Eine Vielzahl aktueller Studien heben deren Bedeutung ebenfalls hervor [129, 157, 163-165]. So bestätigen Bienvenu *et al.* in einer gepoolten Meta-Analyse aus 24 eingeschlossen Studien, dass die Mutationen Ser-663→Pro (OR 7.25, 95% CI 3.50-15.00; $p < 0.00001$) und Phe-659→del (OR 5.66, 1.22-26.18; $p = 0.03$) signifikant mit erhöhten Micafungin-MHKs assoziiert werden können [129].

Als Grund für diese ausgeprägte Echinocandin-Resistenz könnten die chemischen Eigenschaften der jeweils am Austausch beteiligten Aminosäuren diskutiert werden. Interessanterweise wird an der Position Ser-663 die polare Aminosäure Serin (Ser) jeweils gegen eine hydrophobe unpolare Aminosäure (Phenylalanin (Phe), Prolin (Pro) oder Tryptophan (Trp)) ausgetauscht. Diese Änderung der Polarität könnte, durch eine möglicherweise drastische Abnahme der Affinität des Antimykotikums zur 1,3- β -D-Glucan-Synthase bedingt, als einer der Gründe für erhöhte MHK-Werte und Resistenzen bei Isolaten mit diesen Mutationen gelten. Weiterhin ist bemerkenswert, dass, im Vergleich zu einem beliebigen Austausch von Aminosäuren, eine vollständige Deletion an der Position Phe-659 den größten Einfluss auf die Resistenz gegenüber Echinocandinen zu haben scheint (Abb. 17). Intensivere Analysen der dreidimensionalen Fks-Proteinstrukturen könnten zur Erklärung solcher Phänomene einen wesentlichen Beitrag leisten.

Sowohl der Datensatz als auch die angeschlossenen Analysen unterliegen bestimmten Limitationen. Innerhalb der Mutationsanalysen diente ausschließlich Anidulafungin als Haupttestsubstanz bzgl. der Assoziation von Echinocandin-Resistenzen und spezifischer Positionen oder Mutationen (Abb.16; Abb.17). Die

so erhobenen Beobachtungen bestätigten sich durch eine zusätzliche Mutationsanalyse mittels Caspofungin. Die alleinige Auswertung der Caspofungin MHK-Werte ist jedoch limitiert (Abb. 18). Einerseits ist aktuell, aufgrund diskordanter Ergebnisse und Varianzen in der Reproduzierbarkeit verschiedener Laboratorien bzgl. Ausführung der Referenzmethode [166-168], kein BP für Caspofungin nach EUCAST etabliert [97]; Andererseits ist ein Großteil der MHK-Werte (n=30) an der oberen Grenze der Messskala mit >8 mg/L gemessen worden, sodass die wahren Werte nicht ermittelt werden konnten, was die statistische Auswertung schwächt (Ab. 18). Ferner bieten die Ergebnisse dieser Arbeit eine Momentaufnahme der aktuellen epidemiologischen Situation klinisch relevanter *C. glabrata* Isolate in Deutschland. Die analysierten Isolate aus der durch das NRZMyk zusammengetragenen und bereitgestellten Stammsammlung, wurde von den jeweiligen contribuierenden Laboren in Hinblick auf phänotypische Besonderheiten und mit dem Ziel, diese durch nicht in der Laborroutine gebräuchliche Methoden einer weiteren Instanz zu validieren, präselektiert. Die Auslese ist daher nicht repräsentativ, sondern als eine zu Gunsten mutierter Phänotypen verzerrte Teilmenge von *C. glabrata* Isolaten aus Deutschland zu werten. Jegliche Schätzungen über die Gesamthäufigkeit der Resistenzprofile von *C. glabrata* in Deutschland sind somit ausgeschlossen. Die Tatsache, dass hier eine der größten europäischen, evtl. sogar weltweiten Sammlungen klinischer Echinocandin-resistenter Isolate einer systematischen Analyse unterzogen wurde, bleibt davon unberührt.

4.1.2 Phänotypische Resistenztestungen und Borderline-Stämme

In der initialen phänotypischen Resistenztestung ist bei 93 % (163/176) der untersuchten Isolate eine korrekte Differenzierung zwischen FKS^{wt} und FKS^{mut} allein durch die Referenzmethode Mikrodilution mittels Anidulafungin unter Anwendung des aktuellen BP nach EUCAST möglich (Abb.14). 100 % (92/92) der Isolate, die sich als phänotypisch sensibel gegenüber Anidulafungin erweisen, weisen ebenfalls keine relevante FKS -HS Mutation auf, was die in der Fachliteratur konsensuale These unterstreicht, dass ausschließlich FKS -HS Mutationen eine Resistenz gegenüber Echinocandinen verleihen (Abb.14) [51, 169]. Die Entwicklung und stetige Anpassung von BP dient ausschließlich dem Zweck möglichst präzise zwischen Wildtyp / Nicht-Wildtyp Isolaten zu diskriminieren [126, 157, 170]. Dies geschieht auf Grundlage eines diffizilen Zusammenspiels komplexer miteinander verwobener Faktoren wie u. a. Enzymkinetiken der β -1,3-D-Glucansynthetase, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der applizierten Echinocandine oder aber klinische Outcome-Daten [126, 157, 170]. Eine Minderheit von 7 % (13/176) der in der Studie analysierten Isolate, stehen jedoch in Diskrepanz zu eben Diskutiertem, da diese mittels Referenzverfahren initial anhand von Anidulafungin phänotypisch als resistent bewertet werden, ohne dass entsprechende FKS -Mutationen gefunden werden konnten (Abb.14, Tab.15). Die ergo notwendige Ausweitung der Testverfahren als auch der eingesetzten Echinocandine zur weiteren Untersuchung und phänotypischen Überprüfung dieser wenigen, nicht dem klassischen Muster entsprechenden Isolate, führt zu nun beschriebenen Schlussfolgerungen. 11 der insgesamt 13 Stämme zeigen MHK-Werte für Anidulafungin, die - bei ausgeweiteter Testung um zusätzliche vier Verfahren - je nach Anwendung und Referenz BP entweder als resistent oder aber sensibel bzw. intermediär bewertet werden (Tab.15). Neben der Inkonsistenz der Messungen ist zu attestieren, dass in den meisten Fällen eine Abweichung von ein bis zu zwei MHK-Stufen - entweder in die eine oder aber in die andere Richtung - um den BP zu beobachten ist. Dieses Phänomen der Undulation wird somit als Anidulafungin „Borderline“ Resistenz (AND^B) gedeutet. Im Vergleich zur

ebenso erfolgten Micafungin-Testung, erweisen sich dieselben 11 Stämme in allen durchgeführten Resistenztestungen bemerkenswerterweise - bis auf einen Ausreißer - durchweg als Micafungin sensibel. Dies könnte ggf. im Zusammenhang mit einer höheren Trennschärfe des Antimykotikums und / oder des aktuell gesetzten BP gesehen werden, sodass, verglichen zu Anidulafungin, evtl. eine bessere Auflösung bzgl. der Diskrimination von *FKS^{wt}*-Isolaten zu diskutieren ist. Die Studie von Pham *et al.* untermauert die angestellten Überlegungen, indem sie Micafungin mit 91 %, gefolgt von Anidulafungin (85 %) und Caspofungin (81 %) als stärksten phänotypischen Prädiktor (validiert nach CLSI) für zuvor via Sequenzanalyse als *FKS^{mut}*-klassifizierte Isolate bestätigt [157]. Zu diskutierende Problemlösungen wären z. B. Anpassung des aktuellen Anidulafungin BP nach EUCAST durch die Implementierung einer so genannten Area of Technical Uncertainty (ATU) Pufferzone. So könnte bei Anidulafungin MHK-Werten von exakt 0,125 mg/L keine Aussage über Resistenz oder Sensibilität der getesteten Isolate getroffen werden, was eine erneute Überprüfung durch ein anderes phänotypisches Verfahren nach sich ziehen würde. Wäre auch dort keine eindeutige Überprüfung möglich, ist eine weitere Abklärung durch Referenzlaboratorien und die Klassifizierung als „Borderline“ denkbar. Ein offensichtlicher Nachteil der Vorgehensweise wäre eine deutlich verlängerte Zeitspanne bis zur Befundmitteilung. Zudem würden sechs Isolate dieser Studie mit relevanter Mutation und Anidulafungin MHK-Werten von 0,125 mg/L zunächst als „Borderline“ fehlklassifiziert (Abb.17). Für Abhilfe könnte in diesen seltenen Fällen die Empfehlung einer additiven Testung von Micafungin sorgen.

Limitationen liegen in der Natur von Resistenztestungen. Selbst unter Ausführung der Referenzmethode Mikrodilution können gemessene MHK-Werte um + / - einer Kavität und folglich einer Dilutionsstufe variieren. Faktoren wie behandelte / unbehandelte Mikrotiterplatten, verschiedene Antimykotika-Chargen oder Unterschiede in den verwendeten Medien mögen daran beteiligt sein [167]. Zur Minimierung der Varianz und gleichzeitigem Ausschluss individueller Anwendungsfehler wurden ausgewählte Isolate durch externe

Labore verblindet getestet und somit sowohl der Datensatz erweitert als auch die Validität der Ergebnisse in sich gestärkt.

Resümierend ist die phänotypische Testung zur Identifizierung von Echinocandin-Resistenzen in *C. glabrata*, ein probates, verfügbares und oftmals kostengünstiges Verfahren, welches, trotz der skizzierten Nachteile (u. a. Dauer, Trennschärfe, verschiedene Methoden), ein unverzichtbares Instrumentarium innerhalb der Labordiagnostik darstellt, um Lücken molekularer Techniken zu schließen und neue, evtl. noch unbekannte und nicht an Mutationen geknüpfte Resistenzmechanismen zu erkennen.

4.2 Ringversuch: AND^R/FKS^{wt} in *C. glabrata*, ein Paradigmenwechsel?

Zwei der 13 Stämme (CG22 und CG56), welche initial als AND^R/FKS^{wt} eingestuft wurden, sind auch in erweiterter phänotypischer Testung resistent gegen Anidulafungin (Tab.14). Ein Isolat (CG56) erweist sich sogar unter Analyse aller zu bewertenden Testungen und BP als konsistent resistent gegen Anidulafungin, Micafungin als auch Caspofungin, ohne jedwede *FKS*-HS Mutation, selbst nach wiederholten Sequenzierungen, zu offenbaren (Tab.14). Um eine externe unabhängige Validation der eigenen Ergebnisse zu ermöglichen und diese im besten Falle weiter zu bekräftigen, wurden u. a. die zur Diskussion stehenden Isolate CG22 und CG56 neben Kontrollstämmen (CG1 Wildtyp; CG27 *FKS*^{mut}) an 10 nationale mikrobiologische Institute versandt. Durch diesen verblinden Ringversuch und unter der Prämisse, dass mindestens Anidulafungin oder Micafungin mit einem in der eigenen Routinediagnostik üblichen Methode zu verwenden sei, können nun folgende Schlüsse gezogen werden (Tab.15). 8 der 11 Laboratorien, die vorherig durchgeführten eigenen Testungen eingeschlossen, bewerten das Isolat CG22 phänotypisch als Anidulafungin resistent. Micafungin wird hingegen in Bezug auf dasselbe Isolat von 10 der 11 Laboratorien als sensibel eingestuft. Somit werden zwar die eigenen Beobachtungen extern bestätigt, jedoch bleibt letzten Endes unklar, ob dies einen extremen Borderline-Phänotyp bei einem sonst *in vivo* sensiblen Isolat widerspiegelt oder aber ob dies auf einen noch unbekanntem Mechanismus hindeutet, dem eine selektive Resistenz gegenüber Anidulafungin zugrunde liegen könnte. Zumindest wurden von Arendrup *et al.* bereits divergente *in vivo* Aktivitäten unterschiedlicher Echinocandine im Mausmodell unter Infektion mit verschiedenen *C. glabrata*-Mutanten beschrieben [171].

Die hier thematisierten Hinweise lassen in jeder Hinsicht berechnigte Zweifel in Bezug auf das Paradigma vollständiger Kreuzresistenzen innerhalb der Antimykotika-Klasse der Echinocandine zu [51, 171]. Eine weitere kritische Prüfung und Evaluation ist in diesem Zusammenhang dringend indiziert, um prospektiv Fehltherapien, aber auch ein unnötiges Absetzen von Erstlinientherapeutika, im Sinne einer optimalen Patienten*innenversorgung zu minimieren.

Noch eindrucksvoller ist das Isolat CG56, welches ein weiteres Paradigma in Frage stellt. Dies wird in den externen Testungen gegen alle Echinocandine mit insgesamt 26 erhobenen MHK-Werten als resistent klassifiziert, womit auch die eigenen Ergebnisse bestätigt werden können (Tab.15). Einzig ein durchgeführter Micafungin Epsilometerest wird für CG56 als sensibel interpretiert, was jedoch gleichermaßen für zwei Anidulafungin Epsilometereste in der *FKS^{mut}* Kontrolle (CG27) gilt. Einer der falsch sensibel gemessenen Eteste kann noch durch eine angeschlossene Resistenztestung mittels MICRONAUT-AM korrigiert werden, sodass u. a. das subjektive Ablesen dieser Methode per se als Ursache für Fehlinterpretationen zu vermuten ist (Tab.15) [124].

Folglich fungieren die hier präsentierten Ergebnisse als Anhalt, dass Echinocandin-Resistenzen - nicht wie allgemein in der Fachliteratur angenommen - nur exklusiv über *FKS*-HS Mutationen vermittelt werden [51, 157]. Über diese Arbeit hinaus stehen deshalb funktionelle, biochemische und genomische Analysen (zur Detektion evtl. unbekannter nicht HS-Mutationen) im aktuellen wissenschaftlichen Fokus, um die molekularen Mechanismen aufzuklären, die eine *FKS*-HS unabhängige Resistenz vermitteln könnten. Untersuchungen wie z. B. Ganz-Genom- oder Transkriptom-Analysen, aber auch allein die Bestimmung der Expressionslevel der *FKS*-Gene, könnten zum weiteren Verständnis beitragen. Ebenfalls wären Infektionsexperimente mithilfe breiter etablierter muriner Modelle denkbar, um einen Eindruck des *in vivo* Virulenzverhaltens dieser Stämme - v. a. im Vergleich zu Isolaten mit Mutation - zu gewinnen.

Neben den bereits thematisierten Schwierigkeiten des Epsilometertests können weitere Schwachstellen innerhalb der Methoden bzgl. phänotypischer Resistenztestungen durch den Ringversuch identifiziert werden. So enthält die VITEK2 Resistenzkarte, validiert nach EUCAST (BioMérieux, Frankreich), kein Anidulafungin und das enthaltende Caspofungin ist nicht beurteilbar. Die getesteten Konzentrationen für Micafungin indes decken nicht den BP von 0,03 mg/L ab, sodass dieser Test nicht in der Lage ist, adäquat zwischen resistenten- und Wildtyp-Isolaten zu unterscheiden (Tab.15).

4.3 SCV-Fluconazol- und MDR-Resistenzen

Die diskutierte steigende Inzidenz erworbener Echinocandin-Resistenzen in *C. glabrata* in Kombination mit einer gleichzeitig intrinsisch verminderten Azol-Empfindlichkeit sind Hauptgründe für die Entwicklung multiresistenter (MDR) *C. glabrata*-Isolate [51, 52, 169, 172, 173].

Bereits 2008 zeigten Tumbarello *et al.* in einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie, dass unter Fluconazol-Therapie die für Effluxpumpen codierenden Gene *CgCDR1* und *CgCDR2* in *C. glabrata* hochreguliert werden und forderten folglich, Candidämie-Patienten*innen mit vorheriger Azol-Exposition durch andere Breitbandantimykotika zu behandeln [174]. Die EUCAST lässt eine Interpretation der Fluconazol BP nur nach „R“ (resistent) oder „I“ (intermediär; engl. increased) zu, sodass im letzteren Fall immer initial erhöhte Dosierungen zur Therapie empfohlen werden [97]. Neben Effluxpumpen und deren Regulatoren werden eine Reihe weiterer möglicher Resistenzmechanismen wie u. a. direkte *ERG11*-Mutationen, wodurch die Bindungsaffinität von Azolen an das Zielenzym der Cytochrom-P450 abhängigen C14-Demethylase reduziert wird, für *C. glabrata* diskutiert [51, 175]. Durch die Zurverfügungstellung klinischer sogenannter „Small Colony Variants“ (SCV) oder „petite“ *C. glabrata*-Phänotypen trägt diese Arbeit zur Erforschung eines weiteren potenziellen Resistenzmechanismus bei. So zeigen Siscar-Lewin *et al.* mit Hilfe dieser Sammlung, dass die Deletion des Gens *CgMIP1*, welches die mitochondriale DNA-Polymerase kodiert, zwar - wie erwartet - zu SCV-Phänotypen mit einhergehenden Fitness-Defekten (u. a. langsames Wachstum) führt aber gleichzeitig sowohl eine Erhöhung der Azol-Resistenz als auch der Phagozytose-Überlebenswahrscheinlichkeit zu beobachten sind [58]. Interessanterweise findet die Induktion zur Ausprägung von Petite-Phänotypen unabhängig sowohl über eine Makrophagen- als auch über eine Azol-Exposition statt. Diese Wechselwirkung könnte auf der einen Seite eine durch die Immunantwort induzierte Azol-Resistenz sowie auf der anderen Seite einen durch Azol-Therapie ausgelösten Überlebensvorteil gegenüber Makrophagen bedingen [58]. Somit wäre der Verlust von *CgMIP1* als

eigenständiger Virulenzfaktor und Ausgangspunkt ebendieses Resistenz-Mechanismus zu werten, welcher in der aktuell durchgeführten Routinediagnostik aufgrund zu kurzer Inkubationszeit nicht erfasst wird [58]. Weitere Studien sind an dieser Stelle notwendig, um, wie im Zusammenhang von SCV-Phänotypen anderer Mikroorganismen bereits geschehen (z.B. chronische Infektionen bei *Staphylococcus aureus*), die klinisch-pathologische Bedeutung weiter zu ergründen [176, 177]. Die hier erhobenen Daten zum Vorkommen von *C. glabrata*-SCV in der klinischen Diagnostik weisen darauf hin, dass es sich um seltene aber durchaus relevante Phänotypen handeln könnte.

15 % (26/176) der analysierten Isolate zeigen eine kombinierte Anidulafungin-Fluconazol-Resistenz, von denen neun mit Blutstrominfektionen assoziiert sind (Tab.16). Unter Hinzunahme der vorhandenen Outcome-Daten wird deutlich, dass ausschließlich Patienten*innen (n=3), bei welchen Stämme mit einer Ser-663→Pro Mutation (in *FKS2*-HS1) aus dem Blut isoliert wurden, der Infektion erlagen. Eine Resistenzentwicklung und anschließende Durchbruchinfektion unter Therapie, wie in der Studie von Beyda *et al.* bei selbigem Phänotyp (n=4) beschrieben, ist höchst wahrscheinlich [178]. Interpretativ wäre demnach, unter Beachtung der diskutierten signifikanten Assoziation zu erhöhten Echinocandin-MHK-Werten, das Bedingungsgefüge zwischen Resistenztestung *in vitro* und Auswirkung *in vivo* geschlossen, sodass eine erhöhte Mortalität in Bezug auf die Mutation Ser-663→Pro - der Datenlage nach - plausibel erscheint. Therapeutisch verbleibt als letzte Option im Arsenal antifungal wirksamer Substanzen oftmals nur die Applikation von Amphotericin B. Dieses Antimykotikum aus der Klasse der Polyene führt über die Komplexbildung mit Ergosterol zu einer Destruktion der fungalen Zellwand [179]. Resistenzen sind in der aktuellen Fachliteratur für *C. glabrata* selten beschrieben und stehen zumeist im Zusammenhang mit einer gestörten Ergosterolbiosynthese [180, 181]. Klinisch sind wiederholte Gaben von Amphotericin B u. a. mit schweren Nebenwirkungen, wie einer erhöhten Nephrotoxizität oder Elektrolytverschiebungen, verbunden, sodass die zugrundeliegende Indikation vor Applikation gut abgewogen werden sollte [76, 77, 182].

In Reaktion auf die globale Zunahme multi-resistenter Pilzisolat sowie damit einhergehender therapeutischer Limitationen ist die Ausweitung von Antimicrobial-Stewardship-Programmen dringend erforderlich [183, 184]. Der - in dem Kontext - rationale Umgang mit Antimykotika ist nicht nur von ökonomischer Relevanz, sondern er vermag gleichfalls die Mortalität zu reduzieren und überlange Therapien mit dem Risiko der Resistenzbildung zu verhindern [185-188]. Außerdem sollten Surveillance-Netzwerke weiter ausgebaut werden, um ein aktives Monitoring dieser zu schweren Infektionen führenden Pathogene zu ermöglichen.

4.4 Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse tragen zu den im Weiteren erörterten Schlussfolgerungen wesentlich bei und dienen somit der Beantwortung eingangs (in 1.4) diskutierter Fragestellungen.

Falls verfügbar sind genotypische Verfahren zur Resistenztestung ein schnelles und zuverlässiges Werkzeug zur Identifikation der relevantesten, jedoch noch nicht aller Mutationen, welche in Zusammenhang mit resistenten Phänotypen und einem möglichen Therapieversagen stehen. Ein großer Vorteil ist das kurze Zeitfenster der Methode, sodass unter Umständen direkt Einfluss auf empirische Therapien genommen werden kann. Hier bedarf es dringend weiterer Forschung.

Phänotypische Resistenztestungen stellen wesentlich verfügbarere und lang etablierte Verfahren dar, die zwar material- und zeitintensiv in der Ausführung sind jedoch auch Resistenzen, welche nicht durch Mutationen vermittelt werden, zuverlässig detektieren. Micafungin scheint eine stärkere Trennschäfte zwischen FKS^{wt} / FKS^{mut} als Anidulafungin in ebendiesen Resistenztestungen aufzuweisen, was eine direkte Auswirkung auf die Routinediagnostik impliziert.

Paradigmen wie das Vorliegen vollständiger Kreuzresistenzen innerhalb der Echinocandin-Klasse oder wie die Bestimmung von FKS -HS Mutationen als einzigem Resistenzmechanismus sollten in Zusammenhang mit den hier diskutierten Daten weiter kritisch auf ihre Validität geprüft werden.

C. glabrata-SCV können in geringer Anzahl aus klinischen Proben isoliert werden und scheinen mit einem sich bedingenden Vorteil gegenüber Immunsystem und Azol-Therapie an Virulenz zu gewinnen. Weiterführende Studien sind nötig, um diesen Zusammenhang zu beleuchten und um evtl. Rückschlüsse auf die klinische Relevanz dieser Beobachtung anzuschließen.

Multiresistente Stämme bedürfen einer engmaschigen Surveillance, z. B. durch geeignete Sentinelnetzwerke, um weitere epidemiologische Rückschlüsse wie z. B. der Gesamtinzidenz in Deutschland zu ermöglichen.

Abschließend ist festzustellen, dass neue antimykotische Substanzen, wie u. a. das zurzeit in der Testphase befindliche langwirksame Echinocandin Rezafungin, dringend als Verstärkung des Arsenalts zur Therapie invasiver Pilzinfektionen geeigneter Pharmaka benötigt werden.

5 Zusammenfassung

Candida glabrata ist die zweithäufigste Ursache von Candidämien und invasiven Hefepilzinfektionen in Europa. Im Gegensatz zu *Candida albicans* zeigt *C. glabrata* eine reduzierte Empfindlichkeit gegen bestimmte Antimykotika und kann unter Therapie rasch Resistenzen entwickeln.

Diese Arbeit umfasst eine systematische geno- und phänotypische Resistenzanalyse einer der größten europäischen - durch das NRZMyk in 5 Jahren zusammengetragenen - *C. glabrata* Stammsammlungen bestehend aus 176 klinisch relevanter Isolate. 84 der Stämme wurden anhand Referenztestung nach EUCAST zunächst als Anidulafungin (AND) resistent eingestuft. 71 wiesen konkordante Mutationen in den für die Glucan-Synthetase kodierenden *FKS*-Genen auf (13 % in *FKS1*, 87 % in *FKS2*). Vor allem die Mutationsposition Ser- 663 (*FKS2*-HS1) imponierte mit signifikant erhöhten AND MHK-Werten. 11 *FKS*-Wildtyp-Isolate, die ursprünglich als AND resistent klassifiziert wurden, wiesen nach Testung mittels multipler Systeme um den Breakpoint undulierende AND MHK-Werte auf. Zwei *FKS*-Wildtyp Isolate zeigten durchgängig hohe AND MHK-Werte und mussten daher - trotz fehlender Zielgenmutationen - als resistent eingestuft werden. Diese extremen Phänotypen wurden mit Hilfe eines verblindeten nationalen Ringversuchs durch 10 partizipierende Labore bestätigt. Mehr als ein Drittel Echinocandin-resistenter Isolate wiesen eine gleichzeitige Fluconazol-Resistenz auf. Stämme aus Blutstrominfektionen und Ser-663 Mutation waren mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Ein weiteres Kernelement war die Detektion von Azol-resistenten *C. glabrata* petite-Phänotypen in der diagnostischen Routine. Hier wurden innerhalb von 8 Monaten 20 relevante Isolate identifiziert, die acht Patienten*innen zugeordnet wurden.

Die Ergebnisse belegen das regelmäßige Auftreten single- / multidrug-resistenter *C. glabrata* Isolate in Deutschland. Phänotypische Resistenztestungen können zu Fehlklassifizierung von sensiblen Isolaten führen. *FKS*-Genotypisierungen hingegen sind ein nützliches Tool zur Identifizierung relevanter Resistenzen. In seltenen Fällen scheint jedoch eine Echinocandin-Resistenz ohne genotypisches Korrelat (*FKS* Mutation) möglich zu sein.

6 Literaturverzeichnis

1. von Lilienfeld-Toal, M., et al., *Invasive Fungal Infection*. Dtsch Arztebl Int, 2019. **116**(16): p. 271-278.
2. Bitar, D., et al., *Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010*. Emerg Infect Dis, 2014. **20**(7): p. 1149-55.
3. Ruhnke, M., et al., *Estimated burden of fungal infections in Germany*. Mycoses, 2015. **58 Suppl 5**: p. 22-8.
4. May, R.C., et al., *Cryptococcus: from environmental saprophyte to global pathogen*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(2): p. 106-17.
5. Ostrosky-Zeichner, L. and M. Al-Obaidi, *Invasive Fungal Infections in the Intensive Care Unit*. Infect Dis Clin North Am, 2017. **31**(3): p. 475-487.
6. Walther, G., L. Wagner, and O. Kurzai, *Outbreaks of Mucorales and the Species Involved*. Mycopathologia, 2020. **185**(5): p. 765-781.
7. Walther, G., et al., *Fusarium Keratitis in Germany*. J Clin Microbiol, 2017. **55**(10): p. 2983-2995.
8. Ullmann, A.J., et al., *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT)*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 7**: p. 53-67.
9. Hope, W.W., et al., *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by Candida spp.* Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 7**: p. 38-52.
10. Lortholary, O., et al., *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: patients with HIV infection or AIDS*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 7**: p. 68-77.
11. Baker, A.W., et al., *Invasive Fungal Infection After Lung Transplantation: Epidemiology in the Setting of Antifungal Prophylaxis*. Clin Infect Dis, 2020. **70**(1): p. 30-39.
12. Ferrarese, A., et al., *Invasive fungal infection before and after liver transplantation*. World J Gastroenterol, 2020. **26**(47): p. 7485-7496.
13. Chen, C.Y., et al., *Chronic disseminated candidiasis manifesting as hepatosplenic abscesses among patients with hematological malignancies*. BMC Infect Dis, 2019. **19**(1): p. 635.
14. Aldejohann, A.M., et al., *First case of Kluyveromyces marxianus (Candida kefyr) late onset keratitis after lamellar endothelial corneal graft*. Med Mycol Case Rep, 2021. **32**: p. 21-24.
15. Magill, S.S., et al., *Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections*. N Engl J Med, 2014. **370**(13): p. 1198-208.
16. McCarty, T.P. and P.G. Pappas, *Invasive Candidiasis*. Infect Dis Clin North Am, 2016. **30**(1): p. 103-24.
17. Pappas, P.G., et al., *A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(5): p. 634-43.
18. Borman, A.M. and E.M. Johnson, *Name Changes for Fungi of Medical Importance, 2018 to 2019*. J Clin Microbiol, 2021. **59**(2).
19. Pappas, P.G., et al., *Invasive candidiasis*. Nat Rev Dis Primers, 2018. **4**: p. 18026.
20. Chowdhary, A., C. Sharma, and J.F. Meis, *Candida auris: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally*. PLoS Pathog, 2017. **13**(5): p. e1006290.

21. Kullberg, B.J. and M.C. Arendrup, *Invasive Candidiasis*. N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1445-56.
22. Pfaller, M.A. and D.J. Diekema, *Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(1): p. 133-63.
23. Yapar, N., *Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis*. Ther Clin Risk Manag, 2014. **10**: p. 95-105.
24. Pappas, P.G., et al., *Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2016. **62**(4): p. e1-50.
25. Klingspor, L., et al., *Epidemiology of fungaemia in Sweden: A nationwide retrospective observational survey*. Mycoses, 2018. **61**(10): p. 777-785.
26. Colombo, A.L., et al., *Candida and invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with haematological cancer*. Lancet Infect Dis, 2017. **17**(11): p. e344-e356.
27. Fraser, M., et al., *Resistance to echinocandin antifungal agents in the United Kingdom in clinical isolates of Candida glabrata: Fifteen years of interpretation and assessment*. Med Mycol, 2019.
28. Duggan, S., et al., *Host response to Candida albicans bloodstream infection and sepsis*. Virulence, 2015. **6**(4): p. 316-26.
29. Schwab, F., et al., *ICU mortality following ICU-acquired primary bloodstream infections according to the type of pathogen: A prospective cohort study in 937 Germany ICUs (2006-2015)*. PLoS One, 2018. **13**(3): p. e0194210.
30. Anderson, H., *Yeast-like fungi of the human intestinal tract*. J Infect Dis, 1917: p. 341–85.
31. Angoulvant, A., J. Guitard, and C. Hennequin, *Old and new pathogenic Nakaseomyces species: epidemiology, biology, identification, pathogenicity and antifungal resistance*. FEMS Yeast Res, 2016. **16**(2): p. fov114.
32. Lodder J, D.V.N., *Some notes on Torulopsis glabrata (Anderson) nov. comb.* Mycopathologia, 1938. **1**: p. 98–103.
33. Yarrow D, M.S., *Proposal for amendment of the diagnosis of the genus Candida Berkhout nom. cons.* Int J Syst Bacteriol, 1978. **28**.
34. FC., O., *Candida and Candidosis London: Baillere Tindall*. 1988.
35. Kurtzman, C.P., *Phylogenetic circumscription of Saccharomyces, Kluyveromyces and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera Lachancea, Nakaseomyces, Naumovia, Vanderwaltozyma and Zygotoruspora*. FEMS Yeast Res, 2003. **4**(3): p. 233-45.
36. Kurtzman CP, F.J., *The Yeasts A taxonomic Study*. London: Elsevier Science. 1998.
37. Pfaller, M.A., et al., *Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of Candida in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101510.
38. Lamoth, F., et al., *Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis*. J Antimicrob Chemother, 2018. **73**(suppl_1): p. i4-i13.
39. Fidel, P.L., Jr., J.A. Vazquez, and J.D. Sobel, *Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(1): p. 80-96.
40. Rodrigues, C.F., S. Silva, and M. Henriques, *Candida glabrata: a review of its features and resistance*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014. **33**(5): p. 673-88.
41. Silva, S., et al., *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(2): p. 288-305.

42. Hoyer, L.L., et al., *Discovering the secrets of the Candida albicans agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit*. Med Mycol, 2008. **46**(1): p. 1-15.
43. Cormack, B.P., N. Ghori, and S. Falkow, *An adhesin of the yeast pathogen Candida glabrata mediating adherence to human epithelial cells*. Science, 1999. **285**(5427): p. 578-82.
44. Castano, I., et al., *Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in Candida glabrata*. Mol Microbiol, 2005. **55**(4): p. 1246-58.
45. Wachtler, B., et al., *From attachment to damage: defined genes of Candida albicans mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17046.
46. Perlroth, J., B. Choi, and B. Spellberg, *Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment*. Med Mycol, 2007. **45**(4): p. 321-46.
47. Jacobsen, I.D., et al., *Pathogenesis of Candida albicans infections in the alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19741.
48. Li, L., H. Kashleva, and A. Dongari-Bagtzoglou, *Cytotoxic and cytokine-inducing properties of Candida glabrata in single and mixed oral infection models*. Microb Pathog, 2007. **42**(4): p. 138-47.
49. Seider, K., et al., *The facultative intracellular pathogen Candida glabrata subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation*. J Immunol, 2011. **187**(6): p. 3072-86.
50. Roetzer, A., et al., *Autophagy supports Candida glabrata survival during phagocytosis*. Cell Microbiol, 2010. **12**(2): p. 199-216.
51. Arendrup, M.C. and T.F. Patterson, *Multidrug-Resistant Candida: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment*. J Infect Dis, 2017. **216**(suppl_3): p. S445-S451.
52. Arendrup, M.C. and D.S. Perlin, *Echinocandin resistance: an emerging clinical problem?* Curr Opin Infect Dis, 2014. **27**(6): p. 484-92.
53. Pfaller, M.A., et al., *Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of Candida glabrata*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(4): p. 1199-203.
54. Castanheira, M., et al., *Frequency of fks mutations among Candida glabrata isolates from a 10-year global collection of bloodstream infection isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(1): p. 577-80.
55. Chen, X.J. and G.D. Clark-Walker, *The petite mutation in yeasts: 50 years on*. Int Rev Cytol, 2000. **194**: p. 197-238.
56. Goldring, E.S., et al., *The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide*. J Mol Biol, 1970. **52**(2): p. 323-35.
57. Bouchara, J.P., et al., *In-vivo selection of an azole-resistant petite mutant of Candida glabrata*. J Med Microbiol, 2000. **49**(11): p. 977-984.
58. Siscar-Lewin, S., et al., *Transient Mitochondria Dysfunction Confers Fungal Cross-Resistance against Phagocytic Killing and Fluconazole*. mBio, 2021. **12**(3): p. e0112821.
59. Brun, S., et al., *Biological consequences of petite mutations in Candida glabrata*. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(2): p. 307-14.
60. Denning, D.W., *Echinocandin antifungal drugs*. Lancet, 2003. **362**(9390): p. 1142-51.
61. Nyfeler, R. and W. Keller-Schierlein, *[Metabolites of microorganisms. 143. Echinocandin B, a novel polypeptide-antibiotic from Aspergillus nidulans var.*

- echinulatus: isolation and structural components*]. *Helv Chim Acta*, 1974. **57**(8): p. 2459-77.
62. Masurekar, P.S., et al., *Pneumocandins from Zalerion arboricola. II. Modification of product spectrum by mutation and medium manipulation*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1992. **45**(12): p. 1867-74.
 63. Iwamoto, T., et al., *WF11899A, B and C, novel antifungal lipopeptides. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1994. **47**(10): p. 1084-91.
 64. Graybill, J.R., *The echinocandins, first novel class of antifungals in two decades: will they live up to their promise?* *Int J Clin Pract*, 2001. **55**(9): p. 633-8.
 65. Keating, G.M. and B. Jarvis, *Caspofungin*. *Drugs*, 2001. **61**(8): p. 1121-9; discussion 1130-1.
 66. Douglas, C.M., *Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis*. *Med Mycol*, 2001. **39 Suppl 1**: p. 55-66.
 67. Perlin, D.S., *Current perspectives on echinocandin class drugs*. *Future Microbiol*, 2011. **6**(4): p. 441-57.
 68. Wagener, J., K. Striegler, and N. Wagener, *alpha- and beta-1,3-Glucan Synthesis and Remodeling*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2020. **425**: p. 53-82.
 69. Villanueva, A., et al., *A randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin for the treatment of candidal esophagitis*. *Clin Infect Dis*, 2001. **33**(9): p. 1529-35.
 70. Villanueva, A., et al., *A randomized double-blind study of caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis*. *Am J Med*, 2002. **113**(4): p. 294-9.
 71. Phillips, P., et al., *Multicenter randomized trial of fluconazole versus amphotericin B for treatment of candidemia in non-neutropenic patients*. *Canadian Candidemia Study Group*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1997. **16**(5): p. 337-45.
 72. Rex, J.H., et al., *A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia*. *Candidemia Study Group and the National Institute*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(20): p. 1325-30.
 73. Kartsonis, N., et al., *Efficacy of caspofungin in the treatment of esophageal candidiasis resistant to fluconazole*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2002. **31**(2): p. 183-7.
 74. Reboli, A.C., et al., *Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(24): p. 2472-82.
 75. Mora-Duarte, J., et al., *Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(25): p. 2020-9.
 76. Bates, D.W., et al., *Correlates of acute renal failure in patients receiving parenteral amphotericin B*. *Kidney Int*, 2001. **60**(4): p. 1452-9.
 77. Wazny, L.D. and D.F. Brophy, *Amiloride for the prevention of amphotericin B-induced hypokalemia and hypomagnesemia*. *Ann Pharmacother*, 2000. **34**(1): p. 94-7.
 78. Summers, K.K., et al., *Therapeutic drug monitoring of systemic antifungal therapy*. *J Antimicrob Chemother*, 1997. **40**(6): p. 753-64.
 79. Law, D., et al., *High prevalence of antifungal resistance in Candida spp. from patients with AIDS*. *J Antimicrob Chemother*, 1994. **34**(5): p. 659-68.
 80. Maenza, J.R., et al., *Infection due to fluconazole-resistant Candida in patients with AIDS: prevalence and microbiology*. *Clin Infect Dis*, 1997. **24**(1): p. 28-34.

81. Cornely, O.A., et al., *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 7**: p. 19-37.
82. Pappas, P.G., et al., *Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(5): p. 503-35.
83. Cappelletty, D. and K. Eiselstein-McKittrick, *The echinocandins*. Pharmacotherapy, 2007. **27**(3): p. 369-88.
84. Thompson, G.R., et al., *Rezafungin versus Caspofungin in a Phase 2, Randomized, Double-Blind Study for the Treatment of Candidemia and Invasive Candidiasis- The STRIVE Trial*. Clin Infect Dis, 2020.
85. Wiederhold, N.P., *Review of the Novel Investigational Antifungal Olorofim*. J Fungi (Basel), 2020. **6**(3).
86. Spec, A., et al., *MSG-10: a Phase 2 study of oral ibrexafungerp (SCY-078) following initial echinocandin therapy in non-neutropenic patients with invasive candidiasis*. J Antimicrob Chemother, 2019. **74**(10): p. 3056-3062.
87. Park, S., et al., *Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical Candida sp. isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3264-73.
88. Katiyar, S., M. Pfaller, and T. Edlind, *Candida albicans and Candida glabrata clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(8): p. 2892-4.
89. Garcia-Effron, G., et al., *Effect of Candida glabrata FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(9): p. 3690-9.
90. Perlin, D.S., *Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1354**: p. 1-11.
91. Healey, K.R. and D.S. Perlin, *Fungal Resistance to Echinocandins and the MDR Phenomenon in Candida glabrata*. J Fungi (Basel), 2018. **4**(3).
92. Katiyar, S.K., et al., *Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in Candida glabrata: implications for echinocandin resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(12): p. 6304-9.
93. Healey, K.R., et al., *Differential Regulation of Echinocandin Targets Fks1 and Fks2 in Candida glabrata by the Post-Transcriptional Regulator Ssd1*. J Fungi (Basel), 2020. **6**(3).
94. Lee, K.K., et al., *Elevated cell wall chitin in Candida albicans confers echinocandin resistance in vivo*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(1): p. 208-17.
95. Healey, K.R., et al., *Candida glabrata mutants demonstrating paradoxical reduced caspofungin susceptibility but increased micafungin susceptibility*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(8): p. 3947-9.
96. Singh, A., et al., *Absence of Azole or Echinocandin Resistance in Candida glabrata Isolates in India despite Background Prevalence of Strains with Defects in the DNA Mismatch Repair Pathway*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(6).
97. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, v., 2020. <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>.
98. Bennett, J.E., K. Izumikawa, and K.A. Marr, *Mechanism of increased fluconazole resistance in Candida glabrata during prophylaxis*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(5): p. 1773-7.

99. Cortes, V.A., et al., *Physiological and pathological implications of cholesterol*. Front Biosci (Landmark Ed), 2014. **19**: p. 416-28.
100. Barrett-Bee, K. and G. Dixon, *Ergosterol biosynthesis inhibition: a target for antifungal agents*. Acta Biochim Pol, 1995. **42**(4): p. 465-79.
101. Dunkel, N., et al., *A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical Candida albicans isolate*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(7): p. 1180-90.
102. Ferrari, S., et al., *Gain of function mutations in CgPDR1 of Candida glabrata not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence*. PLoS Pathog, 2009. **5**(1): p. e1000268.
103. Sanglard, D. and A.T. Coste, *Activity of Isavuconazole and Other Azoles against Candida Clinical Isolates and Yeast Model Systems with Known Azole Resistance Mechanisms*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(1): p. 229-38.
104. Dunkel, N., et al., *Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpression in fluconazole-resistant Candida albicans strains*. Mol Microbiol, 2008. **69**(4): p. 827-40.
105. Ferrari, S., et al., *Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in Candida glabrata results in enhanced virulence in mice*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(5): p. 1852-60.
106. Cowen, L.E., et al., *Mechanisms of Antifungal Drug Resistance*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **5**(7): p. a019752.
107. Ben-Ami, R. and D.P. Kontoyiannis, *Resistance to echinocandins comes at a cost: the impact of FKS1 hotspot mutations on Candida albicans fitness and virulence*. Virulence, 2012. **3**(1): p. 95-7.
108. Goemaere, B., et al., *Clonal Spread of Candida glabrata Bloodstream Isolates and Fluconazole Resistance Affected by Prolonged Exposure: a 12-Year Single-Center Study in Belgium*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(8).
109. Farmakiotis, D. and D.P. Kontoyiannis, *Epidemiology of antifungal resistance in human pathogenic yeasts: current viewpoint and practical recommendations for management*. Int J Antimicrob Agents, 2017. **50**(3): p. 318-324.
110. Castanheira, M., et al., *Monitoring Antifungal Resistance in a Global Collection of Invasive Yeasts and Molds: Application of CLSI Epidemiological Cutoff Values and Whole-Genome Sequencing Analysis for Detection of Azole Resistance in Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(10).
111. Alexander, B.D., et al., *Increasing echinocandin resistance in Candida glabrata: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(12): p. 1724-32.
112. Cleveland, A.A., et al., *Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011*. Clin Infect Dis, 2012. **55**(10): p. 1352-61.
113. Shields, R.K., et al., *The presence of an FKS mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(9): p. 4862-9.
114. Barber, A.E., et al., *Comparative Genomics of Serial Candida glabrata Isolates and the Rapid Acquisition of Echinocandin Resistance during Therapy*. Antimicrob Agents Chemother, 2019. **63**(2).
115. M. C. Arendrup, J.M., J. W. Mouton, K. Lagrou, Petr Hamal, J Guinea and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing

- (EUCAST), *EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.2: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts*. 2020.
116. CLSI, *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Document M60, 1st ed.* 2017.
 117. CLSI, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed.* M27 Guidance Document, 2017. **4th ed.**
 118. Arendrup, M.C., et al., *How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v. 10.0 European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST)*. Clin Microbiol Infect, 2020. **26**(11): p. 1464-1472.
 119. Humphries, R.M., A.N. Abbott, and J.A. Hindler, *Understanding and Addressing CLSI Breakpoint Revisions: a Primer for Clinical Laboratories*. J Clin Microbiol, 2019. **57**(6).
 120. Espinel-Ingroff, A., Cuenca-Estrella, M. & Cantón, E, *EUCAST and CLSI: Working Together Towards a Harmonized Method for Antifungal Susceptibility Testing*. Curr Fungal Infect, 2013. **Rep 7**: p. 59–67.
 121. Cuenca-Estrella, M., et al., *Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(5): p. 1782-6.
 122. Pfaller, M.A., et al., *Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of Candida species*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(5): p. 1592-9.
 123. Pfaller, M.A., et al., *Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against Candida spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012. **73**(4): p. 365-8.
 124. Arendrup, M.C., M.A. Pfaller, and G. Danish Fungaemia Study, *Caspofungin Etest susceptibility testing of Candida species: risk of misclassification of susceptible isolates of C. glabrata and C. krusei when adopting the revised CLSI caspofungin breakpoints*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(7): p. 3965-8.
 125. Arendrup, M.C., et al., *Echinocandin susceptibility testing of Candida species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(1): p. 426-39.
 126. Zhao, Y., et al., *Rapid Detection of FKS-Associated Echinocandin Resistance in Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(11): p. 6573-6577.
 127. Pfaller, M.A., *Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment*. Am J Med, 2012. **125**(1 Suppl): p. S3-13.
 128. Perlin, D.S., *Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management*. Drugs, 2014. **74**(14): p. 1573-85.
 129. Biennvenu, A.L., G. Leboucher, and S. Picot, *Comparison of fks gene mutations and minimum inhibitory concentrations for the detection of Candida glabrata resistance to micafungin: A systematic review and meta-analysis*. Mycoses, 2019. **62**(9): p. 835-846.
 130. Satoh, K., et al., *Candida auris sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital*. Microbiol Immunol, 2009. **53**(1): p. 41-4.

131. Chowdhary, A., et al., *New clonal strain of Candida auris, Delhi, India*. Emerg Infect Dis, 2013. **19**(10): p. 1670-3.
132. Ben-Ami, R., et al., *Multidrug-Resistant Candida haemulonii and C. auris, Tel Aviv, Israel*. Emerg Infect Dis, 2017. **23**(1).
133. Emara, M., et al., *Candida auris candidemia in Kuwait, 2014*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(6): p. 1091-2.
134. Magobo, R.E., et al., *Candida auris-associated candidemia, South Africa*. Emerg Infect Dis, 2014. **20**(7): p. 1250-1.
135. Calvo, B., et al., *First report of Candida auris in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia*. J Infect, 2016. **73**(4): p. 369-74.
136. Vallabhaneni, S., et al., *Investigation of the First Seven Reported Cases of Candida auris, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus - United States, May 2013-August 2016*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2016. **65**(44): p. 1234-1237.
137. Morales-Lopez, S.E., et al., *Invasive Infections with Multidrug-Resistant Yeast Candida auris, Colombia*. Emerg Infect Dis, 2017. **23**(1): p. 162-164.
138. Schelenz, S., et al., *First hospital outbreak of the globally emerging Candida auris in a European hospital*. Antimicrob Resist Infect Control, 2016. **5**: p. 35.
139. Ruiz Gaitan, A.C., et al., *Nosocomial fungemia by Candida auris: First four reported cases in continental Europe*. Rev Iberoam Micol, 2017. **34**(1): p. 23-27.
140. Hamprecht, A., et al., *Candida auris in Germany and Previous Exposure to Foreign Healthcare*. Emerg Infect Dis, 2019. **25**(9): p. 1763-1765.
141. Jeffery-Smith, A., et al., *Candida auris: a Review of the Literature*. Clin Microbiol Rev, 2018. **31**(1).
142. Kathuria, S., et al., *Multidrug-Resistant Candida auris Misidentified as Candida haemulonii: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(6): p. 1823-30.
143. Lockhart, S.R., et al., *Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant Candida auris on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses*. Clin Infect Dis, 2017. **64**(2): p. 134-140.
144. Meis, J.F., et al., *Clinical implications of globally emerging azole resistance in Aspergillus fumigatus*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2016. **371**(1709).
145. Iyer, K.R., et al., *Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook*. Nat Rev Microbiol, 2021.
146. Beardsley, J., et al., *Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside*. Future Microbiol, 2018. **13**: p. 1175-1191.
147. Education, L.I.F., *Invasive aspergillosis*. <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/invasive-aspergillosis>.
148. Denning, D.W., et al., *Itraconazole resistance in Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(6): p. 1364-8.
149. Buil, J.B., et al., *Trends in Azole Resistance in Aspergillus fumigatus, the Netherlands, 1994-2016*. Emerg Infect Dis, 2019. **25**(1): p. 176-178.
150. Verweij, P.E., et al., *Azole Resistance in Aspergillus fumigatus: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles?* Clin Infect Dis, 2016. **62**(3): p. 362-8.
151. van der Linden, J.W., et al., *Clinical implications of azole resistance in Aspergillus fumigatus, The Netherlands, 2007-2009*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(10): p. 1846-54.

152. Steinmann, J., et al., *Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany*. J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(5): p. 1522-6.
153. Ballard, E., et al., *In-host microevolution of Aspergillus fumigatus: A phenotypic and genotypic analysis*. Fungal Genet Biol, 2018. **113**: p. 1-13.
154. Berger, S., et al., *Azole Resistance in Aspergillus fumigatus: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture?* Front Microbiol, 2017. **8**: p. 1024.
155. Barber, A.E., et al., *Effects of Agricultural Fungicide Use on Aspergillus fumigatus Abundance, Antifungal Susceptibility, and Population Structure*. mBio, 2020. **11**(6).
156. Pfaller, M.A., et al., *Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of Candida Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(4): p. 1366-77.
157. Pham, C.D., et al., *Role of FKS Mutations in Candida glabrata: MIC values, echinocandin resistance, and multidrug resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(8): p. 4690-6.
158. Sobel, J.D. and S.G. Revankar, *Echinocandins--first-choice or first-line therapy for invasive candidiasis?* N Engl J Med, 2007. **356**(24): p. 2525-6.
159. Tissot, F., et al., *ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients*. Haematologica, 2017. **102**(3): p. 433-444.
160. Pham, C.D., et al., *Development of a Luminex-based multiplex assay for detection of mutations conferring resistance to Echinocandins in Candida glabrata*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(3): p. 790-5.
161. Buil, J.B., et al., *Molecular Detection of Azole-Resistant Aspergillus fumigatus in Clinical Samples*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 515.
162. Montesinos, I., et al., *Culture-Based Methods and Molecular Tools for Azole-Resistant Aspergillus fumigatus Detection in a Belgian University Hospital*. J Clin Microbiol, 2017. **55**(8): p. 2391-2399.
163. Zimbeck, A.J., et al., *FKS mutations and elevated echinocandin MIC values among Candida glabrata isolates from U.S. population-based surveillance*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(12): p. 5042-7.
164. Rivero-Menendez, O., et al., *Clinical and Laboratory Development of Echinocandin Resistance in Candida glabrata: Molecular Characterization*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 1585.
165. Shields, R.K., et al., *Spontaneous Mutational Frequency and FKS Mutation Rates Vary by Echinocandin Agent against Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother, 2019. **63**(1).
166. Espinel-Ingroff, A., et al., *Interlaboratory variability of Caspofungin MICs for Candida spp. Using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent?* Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(12): p. 5836-42.
167. Fothergill, A.W., et al., *Effects of Treated versus Untreated Polystyrene on Caspofungin In Vitro Activity against Candida Species*. J Clin Microbiol, 2016. **54**(3): p. 734-8.
168. Eschenauer, G.A., et al., *Real-world experience with echinocandin MICs against Candida species in a multicenter study of hospitals that routinely perform susceptibility testing of bloodstream isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(4): p. 1897-906.
169. Perlin, D.S., *Echinocandin Resistance in Candida*. Clin Infect Dis, 2015. **61 Suppl 6**: p. S612-7.
170. Pfaller, M.A., et al., *Clinical breakpoints for the echinocandins and Candida revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria*. Drug Resist Updat, 2011. **14**(3): p. 164-76.

171. Arendrup, M.C., et al., *Differential in vivo activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against Candida glabrata isolates with and without FKS resistance mutations*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(5): p. 2435-42.
172. Pristov, K.E. and M.A. Ghannoum, *Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide*. Clin Microbiol Infect, 2019. **25**(7): p. 792-798.
173. Sanguinetti, M., B. Posteraro, and C. Lass-Flörl, *Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact*. Mycoses, 2015. **58 Suppl 2**: p. 2-13.
174. Tumbarello, M., et al., *Fungaemia caused by Candida glabrata with reduced susceptibility to fluconazole due to altered gene expression: risk factors, antifungal treatment and outcome*. J Antimicrob Chemother, 2008. **62**(6): p. 1379-85.
175. Morio, F., et al., *Screening for amino acid substitutions in the Candida albicans Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010. **66**(4): p. 373-84.
176. Proctor, R.A. and G. Peters, *Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications*. Clin Infect Dis, 1998. **27**(3): p. 419-22.
177. Proctor, R.A., et al., *Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(4): p. 295-305.
178. Beyda, N.D., et al., *FKS mutant Candida glabrata: risk factors and outcomes in patients with candidemia*. Clin Infect Dis, 2014. **59**(6): p. 819-25.
179. Carolus, H., et al., *Amphotericin B and Other Polyenes-Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance*. J Fungi (Basel), 2020. **6**(4).
180. Vandeputte, P., et al., *A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(10): p. 3701-9.
181. Hull, C.M., et al., *Two clinical isolates of Candida glabrata exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in ERG2*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(12): p. 6417-21.
182. Stanzani, M., et al., *Retrospective Cohort Analysis of Liposomal Amphotericin B Nephrotoxicity in Patients with Hematological Malignancies*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(9).
183. Barlam, T.F., et al., *Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America*. Clin Infect Dis, 2016. **62**(10): p. e51-77.
184. Capoor, M.R., et al., *Antifungal stewardship with an emphasis on candidaemia*. J Glob Antimicrob Resist, 2019. **19**: p. 262-268.
185. Whitney, L., et al., *Effectiveness of an antifungal stewardship programme at a London teaching hospital 2010-16*. J Antimicrob Chemother, 2019. **74**(1): p. 234-241.
186. Nivoix, Y., et al., *Adherence to recommendations for the use of antifungal agents in a tertiary care hospital*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(10): p. 2506-13.
187. Garey, K.W., et al., *Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(1): p. 25-31.
188. Shah, D.N., et al., *Evaluation of antifungal therapy in patients with candidaemia based on susceptibility testing results: implications for antimicrobial stewardship programmes*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(9): p. 2146-51

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| Abk. | Abkürzung |
| AND | Anidulafungin |
| AND ^B | Anidulafungin „Borderline“ |
| AND ^R | Anidulafungin resistent |
| AND ^S | Anidulafungin sensibel |
| AML | Akute Myeloische Leukämie |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| BP | Breakpoint |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CAS | Caspofungin |
| <i>C. albicans</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>C. glabrata</i> | <i>Candida glabrata</i> |
| CLSI | Clinical & Laboratory Standards Institute |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| engl. | englisch |
| E-Test | Epsilonometer- Test |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| <i>FKS</i> | Gen, welches essenzielle Teile der β -1,3-D- glucan Synthetase kodiert (FK506 Supersensitiv) |
| <i>FKS</i> ^{mut} | Mutiertes <i>FKS</i> -Gen (Punktmutation in einem zugehörigen Hot Spot) |

| | |
|--------------------------|--|
| <i>FKS</i> ^{wt} | <i>FKS</i> -Wildtyp |
| FLC | Fluconazol |
| ggf. | gegebenenfalls |
| GOF | Gain of Function |
| HCL | Salzsäure |
| i.E. | in Etablierung |
| IHM | Institut für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg |
| ITSr-DNA | Interner transkribierter Spacer der ribosomalen DNA |
| kb | Kilobasen(paare) |
| KBE | Kolonie bildende Einheiten |
| lat. | lateinisch |
| m | männlich |
| MHK | Minimale Hemm-Konzentration |
| MIF | Micafungin |
| MIF ^R | Micafungin resistent |
| MIF ^S | Micafungin sensibel |
| mtDNA | Mitochondriale DNA |
| NRZMyk | Nationales Referenzzentrum für Invasive Pilzinfektionen |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| SCV | Small Colony Variants |
| s.u. | siehe unten |
| Tab. | Tabelle |
| TIPS | Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt |
| u.a. | unter anderem |
| vs. | versus |
| VRC | Voriconazol |
| w | weiblich |
| YPD | Yeast extract Peptone Dextrose |

z.B.

zum Beispiel

Aminosäuren

Arg

Arginin

Asn

Asparagin

Asp

Asparaginsäure

Cys

Cystein

Glu

Glutaminsäure

His

Histidin

Ile

Isoleucin

Leu

Leucin

Phe

Phenylalanin

Pro

Prolin

Ser

Serin

Thr

Threonin

Trp

Tryptophan

Tyr

Tyrosin

Val

Valin

Einheiten

%

Prozent

°C

Grad Celsius

g

Gramm

h

Stunde

L

Liter

mg

Milligramm

ml

Milliliter

pH

potentia Hydrogenii

Tm

Schmelztemperatur in °C

U/min

Umdrehungen pro Minute

V

Volt

µl

Mikroliter

II. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1: | Mikroskopische Aufnahme der Hefe <i>C. glabrata</i> | 5 |
| Abbildung 2: | Die Markteinführung neuer Antimykotika zur Behandlung invasiver Pilzinfektionen in den Jahrzehnten 1950-2020 | 6 |
| Abbildung 3: | Schematische Darstellung der β -1,3-D-Glucan-Synthetase innerhalb der fungalen Zellmembran. | 8 |
| Abbildung 4: | Automatisches VITEK2-Testsystem mit AFST-YS08 Resistenzkarte (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) | 15 |
| Abbildung 5: | Beispiel Gelelektrophorese nach <i>FKS</i> -PCR (CG1/CG18/CG19/CG90) | 30 |
| Abbildung 6: | Mikrodilution nach EUCAST: Schematische Belegung der 96-Well-Mikrotiterplatte | 32 |
| Abbildung 7: | MICRONAUT-AM (Merlin Diagnostika- A Bruker Company, Bornheim, Deutschland): Schematische Belegung der 96-Well-Mikrotiterplatte | 34 |
| Abbildung 8: | Beispielhafte Auswertung MICRONAUT-AM anhand von <i>C. glabrata</i> -Isolat CG56 nach 24 h Inkubation. | 35 |
| Abbildung 9: | Sensititre-Yeast-One YO10 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA): Schematische Belegung der 96-Well-Mikrotiterplatte | 37 |
| Abbildung 10: | Beispielhafte Auswertung Sensititre-Yeast-One YO10 anhand von <i>C. glabrata</i> -Isolat CG56 nach 24 h Inkubation | 38 |
| Abbildung 11: | Beispielhafte Befundmitteilung der AST-YS08 Resistenzkarte anhand von <i>C. glabrata</i> -Isolat CG56 | 40 |
| Abbildung 12: | Beispielhafter Anidulafungin-Epsilometertertest anhand von <i>C. glabrata</i> -Isolat CG56 | 41 |
| Abbildung 13: | Proben- und Altersverteilung | 47 |
| Abbildung 14: | Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Resistenzanalyse in Bezug auf das Echinocandin Anidulafungin | 49 |

| | | |
|---------------|---|----|
| Abbildung 15: | Mutationsverteilung anhand der Positionen des Aminosäureaustauschs (<i>FKS2</i> -HS1) | 51 |
| Abbildung 16: | Anidulafungin (AND) MHK- Werte mit Bezug auf die Positionen eines relevanten Aminosäureaustauschs in <i>FKS2</i> HS1 | 52 |
| Abbildung 17: | Verteilung der Anidulafungin MHK-Werte mit Bezug auf diverse einzelne Mutationen mit konsekutivem Aminosäureaustausch oder Deletion innerhalb der Positionen in <i>FKS2</i> HS1 | 53 |
| Abbildung 18: | Caspofungin MHK-Werte mit Bezug auf die Positionen eines relevanten Aminosäureaustauschs in <i>FKS2</i> HS1 | 54 |
| Abbildung 19: | Beispielhafte Darstellung von <i>C. glabrata</i> - „Small Colony Variants“ | 66 |

III. Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabelle 1: | Wildtyp-Aminosäuresequenzen der Transmembrandomänen (TM6 und TM7) der β -1,3-D-Glucan-Synthetase | 8 |
| Tabelle 2: | 178 <i>C. glabrata</i> -Isolate aus der Stammsammlung des Nationalen Referenzzentrums für Invasive Pilzinfektionen zwischen 2015 und 2019 | 18 |
| Tabelle 3: | Mengenangaben zur Herstellung von 500 ml YPD-Festmedium | 25 |
| Tabelle 4: | Mengenangaben zur Herstellung von 500 ml YPD-Flüssigmedium | 25 |
| Tabelle 5: | Ansatz <i>ITS</i> -PCR | 27 |
| Tabelle 6: | Ansatz <i>FKS</i> -PCR | 27 |
| Tabelle 7: | Liste Oligonukleotid-Primer | 28 |
| Tabelle 8: | Komponenten MICRONAUT-AM (Merlin Diagnostika- A Bruker Company, Bornheim, Deutschland) | 34 |
| Tabelle 9: | Komponenten Sensititre-Yeast-One YO10 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) | 37 |
| Tabelle 10: | Interpretationsbereiche und verfügbare Testsubstanzen der AST-YS08 Resistenzkarte für VITEK2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) | 39 |
| Tabelle 11: | Aktuell gültige Breakpoints nach EUCAST und CLSI | 42 |
| Tabelle 12: | Qualitätskontrolle: ATCC 22019 <i>C. parapsilosis</i> MHK-Spannweiten | 43 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabelle 13: | Exemplarische Ergebnisse der Qualitätskontrollen anhand MICRONAUT-AM und Sensititre-Yeast-One | 43 |
| Tabelle 14: | Erweiterte Resistenztestung unter Verwendung multipler Testsysteme | 56 |
| Tabelle 15: | Auswertung Ringversuch | 59 |
| Tabelle 16: | Retrospektiv erhobene klinische Daten von 9 ausgewählten MDR <i>C. glabrata</i> Isolaten | 63 |

IV. Danksagung

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Oliver Kurzai, welcher mich an meinem ersten Arbeitstag in seine Arbeitsgruppe aufnahm, mich für die zahlreichen Facetten der Mykologie zu begeistern verstand und mir schließlich dieses sehr interessante Thema überließ. Sein lösungsorientierter Pragmatismus, seine konstruktive Kritik und wertvollen Ideen trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei. In seinen Funktionen als Vorstand des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg sowie Leiter des Nationalen Referenzzentrums für Invasive Pilzinfektionen (NRZMyk) danke ich ihm für die permanente Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit und Nutzungsmöglichkeit der hier gebotenen Infrastruktur.

Ein großer Dank gilt den weiteren Mitgliedern meines Betreuungskomitees - zusammengesetzt aus Herrn Prof. Dr. Jürgen Löffler und Herrn Prof. Dr. Johannes Wagener - für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ferner danke ich Herrn Dr. Ronny Martin. In ihm fand ich nicht nur einen exzellenten Betreuer, der mich in die Grundlagen akademischen Denkens und alle für diese Arbeit relevanten Methoden einwies, sondern auch einen sehr hilfsbereiten Kollegen und guten Freund, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herzlich bedanke ich mich bei Frau Anastasia Besenfelder und Frau Sabrina Mündlein. Ohne ihre erfrischende und offene Art, ihre wertvollen Erfahrungen in der täglichen Laborroutine und ihre große Hilfsbereitschaft wäre diese Arbeit nicht realisierbar gewesen. Sie beaufsichtigten nicht nur meine ersten Schritte im Labor - nach meiner intensiven Zeit in der Zentralen Notaufnahme Düsseldorf, sondern zeigten mir ebenfalls wie daraus resultierende Verletzungen korrekt zu dokumentieren sind.

Frau Dr. Dr. Michaela Herz gebührt mein Dank für ihre außerordentlich wertvollen Hilfestellungen bezüglich statistischer Analysen. Gerade am Tage der

Einreichung finaler Manuskripte waren ihre ruhige Art und ihre Ratschläge zur abschließenden Formatierung sehr förderlich.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Grit Walther, die die ersten Grundsteine des Datensatzes zusammen mit mir erarbeitete, fehlende Daten ergänzte und jederzeit für Diskussionen zur Verfügung stand.

Ich danke Herrn Stefan Jaborek und Herrn Dominique Krause für ihre Unterstützung im Labor und viele interessante Konversationen. Ebenfalls danke ich der gesamten Arbeitsgruppe und dem Institut für eine entspannte und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Frau Leonie Buhl danke ich für ihre unermüdliche Geduld und liebevolle Unterstützung während einer intensiven Schreibphase.

Nicht an letzter Stelle gebührt ein großer Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich in all meinen Vorhaben vorbehaltlos unterstützten und meine Studienzeit zu einem unvergesslichen Lebensabschnitt werden ließen.

V. Lebenslauf

VI. Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

Poster

Aldejohann A M, Herz M, Martin R, Walther G, Kurzai O (2019) Emerging echinocandin resistance in *Candida glabrata* – an overview of clinical samples from German health care facilities. Poster Session IV.

53th Scientific Conference of the German speaking Mycological Society (DMykG) e. V. Mannheim.

Aldejohann A M, Herz M, Martin R, Walther G, Kurzai O (2021) Single- and multidrug-resistant *Candida glabrata* strains from Germany. Poster Session: Eukaryotic Pathogens (FG EK).

73rd Annual Meeting of the German Society for Hygiene and Microbiology e. V. (DGHM). Online.

Vorträge

Aldejohann A M, Huprich E, Müller C, Martin R, Kurzai O (2019) Changes in the sterole composition of *Candida glabrata* can be linked to increasing Amphotericin B tolerance. Oral Session 16 – Eukaryotic Pathogens: Fighting Back.

6th Joint Conference of DGHM & VAAM. Leipzig.

Aldejohann A M, Huprich E, Müller C, Martin R, Kurzai O (2020) *Candida glabrata* – A yeast escaping amphotericin B by a change of its sterol cell membrane composition? Myk1 Freie Vorträge.

54th Scientific Conference of the German speaking Mycological Society (DMykG) e. V. Online.

Aldejohann A M, Herz M, Martin R, Walther G, Kurzai O (2021) *Candida glabrata* single- and multidrug-resistance: a five-year analysis of clinical samples from German healthcare facilities. Session: Changing landscape of superficial and invasive mycoses.

31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Online.

Veröffentlichungen

Aldejohann A M, Theuersbacher J, Haug L, Lamm O S, Walther G, Kurzai O, Hillenkamp J, Kampik D (2021) First case of *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefyr*) late onset keratitis after lamellar endothelial corneal graft. *Med Mycol Case Rep*, 32: p. 21-24.

Siscar-Lewin S, Gabaldón T, **Aldejohann A M**, Kurzai O, Hube B, Brunke S (2021) Transient mitochondria dysfunction confers fungal cross-resistance between macrophages and fluconazole. *Mbio*,12(3): e0112821.

Aldejohann A M, Herz M, Martin R, Walther G, Kurzai O (2021) Emergence of resistant *Candida glabrata* in Germany. *JAC Antimicrob Resist*, 2021;3(3):dlab122. Published 2021 Aug 7. [doi:10.1093/jacamr/dlab122](https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab122).