

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr.med. Ch. P. Speer**

**Molekulare Typisierung und Antimykotika-Empfindlichkeit
von *Candida*-Spezies aus Sputum-Isolaten von
Mukoviszidose-Patienten**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Michaela Muthig
aus Lohr am Main**

Würzburg, Januar 2006

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. F-M. Müller

Koreferent: Prof. Dr. med. J. Hacker

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 10.08.2006

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis:

<u>I Einleitung</u>	S. 1
<u>II Material und Methoden</u>	S. 4
1. Patienten	S. 4
2. Anzucht und Differenzierung der Hefen	S. 4
3. Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)	S. 5
4. Isolierung chromosomaler DNA	S. 7
5. Molekulare Typisierungen	S. 8
a) Random-Amplified-Polymorphic DNA (RAPD)-PCR	S. 8
b) Southern-Hybridisierung mit der CARE2 – Sonde	S. 9
<u>III Ergebnisteil</u>	S. 12
1. Patientendaten	S. 12
2. Isolate	S. 17
a) Speziesverteilung	S. 17
b) Persistenz der einzelnen <i>Candida</i> -Spezies	S. 19
3. Ergebnisse der <i>in vitro</i>-Antimykotika-Empfindlichkeitstestung	S. 20
a) <i>In vitro</i> -Empfindlichkeit der einzelnen <i>Candida</i> -Spezies	S. 20
b) Erhöhte Werte bei der <i>in vitro</i> -Empfindlichkeitsbestimmung	S. 22
c) Patienten mit Antimykotikabehandlung	S. 24
4. Ergebnisse der Molekularen Typisierung:	S. 27
a) Chronologischer Isolatevergleich eines Patienten	S. 27
b) Persistenz von höchstwahrscheinlich verwandten <i>C. albicans</i> -Arten	S. 29
c) Geschwistervergleich	S. 31
5. <i>Candida dubliniensis</i> bei Mukoviszidose	S. 33
<u>IV Diskussionsteil</u>	S. 35
<u>V Zusammenfassung</u>	S. 56
<u>VI Literaturverzeichnis</u>	S. 58

I Einleitung:

Neben bakteriellen und viralen Infektionen haben in den letzten 15 Jahren opportunistische Pilzinfektionen eine zunehmende Bedeutung bei Patienten mit einer angeborenen oder erworbenen Abwehrschwäche gewonnen.

Der steigende Gebrauch von Breitspektrum-Antibiotika schafft neue Nischen für andere Mikroorganismen, so u. a. auch für Hefen und Schimmelpilze (8;14). Ferner hat die beobachtete Resistenzentwicklung einiger Pilze gegenüber Azol-Antimykotika klinische Bedeutung erlangt (37).

Neben schweren systemischen Pilzinfektionen bei abwehrgeschwächten Patienten wird in den letzten Jahren auch eine vermehrte Besiedelung mit pilzlichen Erregern bei anderen Patientengruppen beobachtet, ohne dass ausreichend untersucht ist, ob diese Erreger auch eine pathogenetische Bedeutung haben.

So ist z. B. bei Mukoviszidose-Patienten seit längerem bekannt, dass diese sich im Verlauf ihrer Erkrankung mit Aspergillen in Form der Allergisch-bronchopulmonalen-Aspergillose (ABPA) auseinandersetzen, ohne jedoch an einer invasiven Aspergillose zu erkranken (14).

Aufgrund der konsequenten antibiotischen Therapie dieser Patienten als einer der Eckpfeiler der Therapie, z. T. in dreimonatigen Intervallen bei Pseudomonas-Besiedelung, ist es zu einer zunehmenden Besiedelung des Respirationstraktes mit Hefen gekommen, ohne dass bekannt ist, ob diesen eine pathogenetische Bedeutung an der chronischen Inflammation in der Lunge zuteil wird (20).

Bei der Mukoviszidose (zystische Fibrose/CF) handelt es sich um einen autosomal rezessiv vererbaren Defekt des CFTR-Gens (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein) auf Chromosom Nr. 7, das für einen Chloridkanal im Epithel exokriner Drüsen kodiert. An der resultierenden Dyskrie sind verschiedene Organsysteme betroffen. Die wichtigsten sind das Pankreas, das im weiteren Verlauf zu einer exokrinen Pankreasinsuffizienz führen kann, und die Lunge. Durch die Störung im Chloridkanal ist der in der Lunge produzierte Schleim viskös und kann so nur schwer abgehustet werden. Dies schafft ein optimales Milieu für verschiedene Mikroorganismen in der Lunge.

Die wichtigsten Erreger sind *Staphylokokkus aureus*, der sich bei über 50% der Patienten nachweisen läßt, ferner die Problemkeime *Pseudomonas aeruginosa* (bei 42% der Patienten nachweisbar) und *Burkholderia cepacia*. Desweiteren sind auch Schimmelpilze, besonders *Aspergillus fumigatus*, und in letzter Zeit immer häufiger Hefepilze im Sputum nachweisbar. Dabei handelt es sich nicht nur um die häufigste Hefeart *Candida albicans*, sondern auch zunehmend um die intrinsisch Antimykotika-resistentere Arten wie *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* u. a. (25;37). Gerade diese non-*albicans* *Candida* Gruppe gewinnt immer mehr an Bedeutung, nicht nur durch ihre zunehmende Inzidenz, vielmehr besitzen einige Vertreter dieser Gruppe eine natürliche Resistenz gegen bestimmte Antimykotika, oder sind besser in der Lage Resistenzen zu entwickeln. So ist z. B. *C. lusitaniae* oftmals resistent gegenüber Amphotericin B (25;45), *C. krusei* ist resistent gegenüber Fluconazol (45), *C. glabrata* entwickelt häufig Resistenzen gegen Fluconazol (45), und auch von der kürzlich neu entdeckten *Candida*-Spezies *C. dubliniensis* ist bekannt, daß es zu *in vitro*-Resistenzen gegenüber Fluconazol kommen kann (35). Diese neue Spezies wurde erstmals bei HIV-Patienten entdeckt und untersucht. Da sie morphologisch große Ähnlichkeit mit *C. albicans* aufweist, gelingt die Spezies-Differenzierung in der Routinediagnostik nicht immer, sie kann aber inzwischen durch bestimmte Methoden, wie z. B. Anzucht auf einem Spezialagar gut differenziert werden (32;44).

Peltroche-Llacsahuanga et al. beschrieben kürzlich das überdurchschnittlich häufige Vorkommen von *C. dubliniensis* bei Mukoviszidose-Patienten (32).

Den Besiedelungen mit Hefen bei der Mukoviszidose ist bisher wenig Beachtung geschenkt worden. Ihre möglichen Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf sind noch nicht genau untersucht und eine antimykotische Therapie (insbesondere gezielt gegen Hefen) gehört daher nicht zum Therapiestandard bei der Mukoviszidose. Deswegen kann noch keine Aussage darüber gemacht werden, ob Hefen den Organismus schädigen können und ob eine antimykotische Therapie überhaupt sinnvoll erscheint. Auch über die Resistenzlage der Hefen bei CF ist noch nicht sehr viel bekannt, obwohl eine steigende Zahl von Patienten aufgrund ihrer ABPA antimykotisch behandelt wird.

Ziel dieser Arbeit war es, die Besiedelung der Hefen von Patienten, die an Mukoviszidose erkrankt sind, über einen Zeitraum von etwa zwei Jahren zu untersuchen unter besonderer Berücksichtigung des Vorkommens der non-*albicans Candida* Spezies, einschließlich *C. dubliniensis*. Ein wesentlicher Teil meiner Untersuchungen beschäftigt sich mit der *in vitro*-Resistenztestung der Hefen, um über die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration eine Aussage darüber zu treffen, welche Medikamente gegen die Keime wirksam sind, und ob natürliche oder erworbene Resistenzen vorliegen.

Dabei wurden sowohl alte Substanzen wie Amphotericin B, 5-Flucytosin, Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol untersucht, als auch das noch in der klinischen Entwicklung befindliche Micafungin als Vertreter einer ganz neuen Substanzklasse mit Angriffspunkt in der Zellwand des Pilzes aus der Familie der Echinocandine.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Besiedelung und Transmission der Hefen: Durch molekulare Typisierung der Isolate (mittels PCR und Southern-Hybridisierung) sollte untersucht werden, inwieweit sich das Keimspektrum über die Zeit verändert, ob neue (evtl. resistente) Keime hinzugekommen sind oder Keime spontan verschwunden sind, ohne größere Auswirkungen zu verursachen. Wichtig ist dabei die Beobachtung, ob einzelne isogenetische Stämme über einen längeren Zeitraum im Respirationstrakt der Patienten persistierten oder nicht.

Ein Nebenaspekt ist die Frage, ob eine Transmission isogener *Candida*-Stämme zwischen erkrankten Geschwistern stattgefunden hat.

Die Frage einer humanpathogenen Bedeutung der Besiedelung mit Hefen bei Mukoviszidose-Patienten ist nicht geklärt. Die Kenntnis der Resistenzlage und Resistenzentwicklung, sowie des Besiedelungs- und Persistenzverhaltens der einzelnen Hefen ist hilfreich, um zu klären, ob eine gezielte antimykotische Therapie bei einzelnen Patienten indiziert erscheint.

II Materialien und Methoden

1. Patienten

In einer prospektiven Untersuchung über zwei Jahre wurden konsekutive Sputen und Rachenabstriche von Mukoviszidose-Patienten der Ambulanz der Universitäts-Kinderklinik Würzburg und der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg hinsichtlich des Erregerspektrums von Hefen und ihrer *in vitro*-Antimykotika-Empfindlichkeit untersucht. Ferner wurden die Isolate auf ihre genetische Verwandtschaft mittels zweier molekularer Typisierungs-Verfahren getestet.

2. Anzucht und Differenzierung der Hefen

Die Gewinnung des Materials erfolgte bei Routineuntersuchungen durch Sammeln von Sputen, bzw -bei jüngeren Kindern (unter ca. 6 Jahren)- durch tiefe Rachenabstriche.

Die Hefen wurden auf Sabouraud-Agar angezüchtet und mittels bunter Reihe und Morphologie auf CHROM-Agar im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg differenziert. Zur Unterscheidung von *C. albicans* und *C. dubliniensis* wurde der fragliche Keim auf Staib-Agar angezüchtet und mikroskopisch durch Nachweis von Hyphen- und Chlamydosporenbildung als *C. dubliniensis* identifiziert (44).

Die isolierten und identifizierten Hefen wurden zum Transport und zur vorübergehenden Aufbewahrung auf Schrägagarröhrchen ausgestrichen und zum Institut für Molekulare Infektionsbiologie transportiert.

Die Isolate wurden dann als Glycerolstocks bei -80°C gelagert (500 μl einer Übernachtkultur aus YPD-Medium (Yeast-Potatoe-Dextrose-Medium) in 1000 μl Glycerin).

3. Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die Methode zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) erfolgte nach der NCCLS M27A Methode unter Modifikation mit High-Resolution (HR)-Medium (30).

Eine 96-Well-Platte wird mit einem Antimykotikum in verschiedenen Konzentrationen gefüllt. Jede Spalte enthält die gleiche Konzentration des Antimykotikums. Von links nach rechts sinkt die Konzentration des Antimykotikums um die Hälfte. In der letzten Spalte ist nur HR-Medium als Wachstumskontrolle. Nach Zugabe des zu untersuchenden Keimes (pro Reihe wird die gleiche Menge derselben Keimlösung beimpft, so dass pro Platte 8 verschiedene Keime auf ihr Resistenzverhalten geprüft werden können) wird die Mikrotiterplatte bebrütet und nach 48 Stunden per Extinktionsmessung ausgewertet. Die Extinktion der Kontrolle (nur mit HR-Medium gefüllte Spalte) gilt dabei als Ausgangswert. Die Minimale Hemmkonzentration ist die Antimykotikum-Konzentration, bei der die Extinktion weniger als 50% der Kontroll-Extinktion beträgt. Dies gilt für die Medikamente Flucytosin, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol und Micafungin. Für Amphotericin B gilt die Minimale Hemmkonzentration als die Antimykotikum-Konzentration, bei der makroskopisch kein Wachstum mehr erkennbar ist.

Für das HR-Medium wurden 16,87 g HR-Substanz (Oxoid, Wesel, Deutschland) und 10 g Glucose in 450 ml destilliertem Wasser gelöst und nach Zugabe von 1 g Asparagin, gelöst in 50 ml dest. Wasser durch einen Vakuumfilter sterilisiert. Nach dieser Filtersterilisation wurde das Medium mit Phosphatpuffer (=720ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, gelöst in Wasser und 280 ml KH_2PO_4 gelöst in Wasser) (beides von Merck, Darmstadt, Deutschland) zu gleichen Teilen gemischt.

Die Medikamente Amphotericin B (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), Voriconazol (Pfizer, Sandwich, UK) und Itraconazol (Janssen-Cilag, Beerse, Belgien) wurden in Dimethyl-sulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst. 5-Flucytosin (ICN, Frankfurt, Deutschland) wurde in 0,9% NaCl gelöst, Fluconazol (Pfizer, Sandwich, UK) in Methanol und destilliertem Wasser und Micafungin (Fujisawa, Japan) wurde in Methanol und 0,9% NaCl gelöst. Anschließend wurden

Verdünnungsreihen mit folgenden Konzentrationen angelegt: Amphotericin B 0,03– 16 µg/ml, 5-Flucytosin 0,03 – 32 µg/ml, Fluconazol 0,125 – 128 µg/ml, Itraconazol 0,03 – 4 µg/ml, Voriconazol 0,03 – 16 µg/ml und Miconazole 0,007 – 8 µg/ml. Dabei wurde das jeweilige Medikament mit HR-Medium verdünnt. Je 100 µl der verschiedenen Konzentrationen wurden in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. (Als Wachstumskontrolle wurden je 100 µl HR-Medium verwendet.)

Die zu untersuchenden Hefen wurden auf Sabouraud-Agar ausgestrichen und 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

Inokulation: Je eine Hefekolonie wurde in 1 ml HR-Medium gelöst und auf eine Konzentration von etwa 1000-3000 CFU/ml mit HR-Medium verdünnt. (Die Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) wurde mikroskopisch mit einer Thomas-Zählkammer bestimmt). Je 100 µl dieser Hefelösung wurde dann zu den 100 µl des zu untersuchenden Medikamentes in die Vertiefungen der 96-Well-Platten pipettiert, so dass nochmals eine 1:1-Verdünnung des Medikaments entstand und die Konzentration der Hefen bei etwa 500-1500 CFU/ml lag.

Nach der Inokulation wurden die Platten über 48 Stunden bei 37°C bebrütet und nach fünfminütigem Schütteln mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 540 nm ausgewertet. (Photometer: Tecan Sunrise, Crailsheim, Deutschland).

Der MHK-Wert der Medikamente Flucytosin, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol und Miconazole wurde photometrisch bestimmt als niedrigste Konzentration des Medikaments, bei der das Wachstum um mehr als 50% gehemmt wurde (Extinktion gegenüber Kontroll-Extinktion weniger als 50%).

Bei Amphotericin B wurde der MHK-Wert visuell bestimmt als die Konzentration, bei der kein Wachstum mehr visuell zu erkennen war.

Zur Qualitätssicherung wurden jeweils die MHK-Werte eines Kontrollstammes bestimmt. Die einzelnen Kontrollen, sowie deren Herkunft zeigt Tabelle 1:

Tabelle 1: Kontrollstämme

A 90028	<i>C. albicans</i>	ATCC*
A 90030	<i>C. glabrata</i>	ATCC
A 22013	<i>C. parapsilosis</i>	ATCC
A 6258	<i>C. krusei</i>	ATCC
CBS 7987	<i>C. dubliniensis</i>	CentraalbureauvoorSchimmelcultures
CBS 94 T	<i>C. tropicalis</i>	CentraalbureauvoorSchimmelcultures
CBS 5901	<i>C. lusitaniae</i>	CentraalbureauvoorSchimmelcultures

*ATCC (American Tissue Culture Collection)

Die Breakpoints der einzelnen Medikamente wurden von dem National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) festgesetzt (30):

5-Flucytosin: empfindlich ≤ 4 , intermediär 8 – 16 und resistent ≥ 32

Fluconazol: empfindlich ≤ 8 , dosisabhängig empfindlich 16 – 32 und resistent > 64

Itraconazol: empfindlich ≤ 0.125 , dosisabhängig empfindlich 0,25-0,5 und resistent ≥ 1

Für Amphotericin B, Voriconazol und Micafungin sind noch keine Breakpoints festgelegt worden.

4. Isolierung chromosomaler DNA (nach Millon et al. 1994) (26)

Für die Extraktion der DNA wurde zuerst eine Hefekolonie in 15 ml YPD-Medium (Yeast-Potatoe-Dextrose-Medium) über Nacht bei 30°C im Schüttler kultiviert. Die Übernachtskulturen wurden am nächsten Tag in 15 ml Greiner-Röhrchen gefüllt und 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Zellmaterial wurde nach Abkippen des Überstandes in 1 ml 1M Sorbitol gelöst und nach Überführung in 2 ml-Eppendorf-Caps 2 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 1 ml Lyticase (= 1M Sorbitol, 100mM NaCitrat pH 5.8, 50mM EDTA pH 8.0, 2% β -Mercaptoethanol und 500 units/ml Lyticase) suspendiert und dieses dann 45 min bei 37°C inkubiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und Abschüttung des Überstandes wurden die Zellen dann in je 800 μ l Proteinase (= 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 50 mM EDTA, pH

8.0, 0,5% SDS und Proteinase K) gelöst und 30 min bei 60°C inkubiert. Nach der Inkubation folgte die Extraktion mit Phenol, indem in drei Extraktionsschritten die Proben mit einem Phenol-Gemisch (Phenol /Chloroform /Isoamylalkohol im Verhältnis von 25:24:1) gemischt wurden und nach Abzentrifugieren des Überstandes in ein weiteres Eppendorf-Cap überführt wurden. Zuletzt erfolgte eine Ausfällung mit 600 µl Isopropanol. Die Proben wurden 5 min zentrifugiert und nach Abkippen des Überstandes in 600 µl 70% Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in 200 µl TE-Puffer (10mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA) gelöst.

Als nächster Schritt wurde die RNA entfernt. Dazu wurde zu der Probe 2 µl RNaseA dazugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Extraktion in zwei Phenolschritten (wie oben beschrieben). Nach der Ausfällung mit 200 µl Isopropanol wurde die DNA wieder in 600 µl 70% Ethanol gewaschen und nach fünfminütigem Abzentrifugieren und kurzem Trocknen in einer geeigneten Menge H₂O dest. gelöst. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Messung der jeweiligen DNA-Konzentration erfolgte mittels Photometer (Ultraspec 3000 von Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) bei 260 nm und 280 nm. Die Ratio sollte zwischen 1,8 und 2,2 betragen. Die angestrebte Konzentration sollte mindestens 2,0 µg/µl betragen.

5. Molekulare Typisierungen:

5 a) Random-Amplified-Polymorphic DNA (RAPD)-PCR (1)

Für die PCR wurde ein Gemisch hergestellt aus 31,5 µl H₂O, 5 µl PCR-Puffer, 10 µl Q-Solution Qiagen, Hilden) und 1 µl Trinucleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP von Gibco, Langley, USA). Zu diesem Gemisch wurden je 1 µl des Primers RPO2 (Sequenz GCG-ATC-CCC-A) (1) und der DNA mit einer Konzentration von 0,02 µg/µl gegeben. Dieses PCR-Gemisch wurde anschließend im Mastercycler Gradient von Eppendorf amplifiziert.

Amplifikation: Initiale Denaturierung von 10 Minuten bei 95°C, anschließend 30 Zyklen bestehend aus 1 min Denaturieren bei 95°C, 1 min Annealing bei 36°C und 2 min Extension bei 72°C. Zum Schluß wurde nochmal eine Extensionsphase von 10 min bei 72°C hinzugefügt.

25 µl der amplifizierten DNA wurden mit 6 µl Mass Loading Dye (MBI-Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland) angefärbt und anschließend in einem Agarose-Gel aufgetrennt (1% Agarose-Gel, Laufpuffer 1x TAE, Laufzeit 3 Stunden bei 80 V). Als Marker wurde 1kB DNA-Ladder von MBI-Fermentas verwendet. Das Gel wurde anschließend ca. 10 min im Ethidiumbromidbad gefärbt und die Auftrennung der Banden mit einem Geldoc (Bio-Rad, Hercules, USA) dokumentiert.

5 b) Southern-Hybridisierung mit der *Candida-repetitives-Element-2 (CARE2) - Sonde*

Herstellen der CARE-2-Sonde:

Die ca 930 bp große CARE2-Sonde wurden hergestellt durch eine PCR-Reaktion mit den Primern CARE2/1 (Sequenz CTCTAAAAGTGTGCTTGGTG) und CARE2/2 (Sequenz AATTTGCACTCATCGAGAGC). Als Template diente chromosomale DNA eines *C. albicans*-Stammes (erstmal publiziert bei Lasker et al, 1992) (21).

Amplifikation: Initiale Denaturierung von 2 min bei 94°C, anschließend 35 Zyklen bestehend aus 1 min Denaturieren bei 92°C, 1 min Annealing bei 50°C und 2 min Extension bei 72°C. Abschließend nochmal eine Extensionsphase von 5 min bei 72°C.

Enzymatische Spaltung und Auftrennung der DNA:

Zur enzymatischen Spaltung wurden 10 µg DNA mit 1 µl *EcoRI*, 3 µl 10x Restriktionspuffer, und einer geeigneten Menge H₂O dest. gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 6 µl 6x Mass-Loading Dye (MBI-Fermentas) dazugegeben, und die Proben anschließend auf einem 1xTAE-Gel (enthält TRIS, Eisessig, EDTA pH 8,0, H₂O) mit einer Laufzeit von 16 Stunden bei 40 Volt aufgetrennt.

Das Gel wurde nach kurzer Färbung im Ethidiumbromidbad mittels Geldoc (Bio-Rad, Hercules, USA) fotografiert und gespeichert.

Southern-Hybridisierung:

Die gespaltene und aufgetrennte DNA wurde mit einem Vakuumblotter vom Gel auf eine Nylonmembran übertragen und zwar durch 15-minütige Depurinierung mit Lösung A (=37% HCL in H₂O), 15-minütige Denaturierung mittels Lösung B (=NaCl, NaOH in H₂O), 15-minütige Neutralisierung mit Lösung C (=NaCl, 1M Tris-Cl pH 7.5 in H₂O) und 90-minütige Transferrierung der DNA auf die Membran mit 20xSSC (=NaCl, NaCitrat in H₂O).

Danach wurde die Membran zum Denaturieren 30 sec in 0,4M NaOH geschwenkt und 30 sec in 0,2M Tris-Cl pH 7.5 neutralisiert. Anschließend wurde die DNA auf der Nylonmembran über einen UV-Cross-Linker fixiert.

Wir gaben dann die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen und inkubierten eine Stunde im Hybridisierungssofen bei 42°C mit vorgewärmter Hybridisierungslösung (= Enhanced Chemiluminescent Labeling, ECL, Enzo Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). In dieser Zeit wurde die Sonde mit ECL markiert: Je 5 µl H₂O dest. und 5 µl CARE2-Sonde wurden 5 min bei 100°C aufgeköcht und nach dem Abkühlen mit je 10 µl Labelling-Reagenz und Glutaraldehyd gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C wurde die Sonde dann zur Hybridisierungslösung hinzugegeben und über Nacht im Hybridisierungssofen inkubiert.

Am nächsten Tag schütteten wir die Hybridisierungslösung ab, gaben 50 ml 5xSSC ins Hybridisierungsröhrchen und inkubierten für 5 min. Anschließend wurde diese Lösung abgeschüttet und für 20 min mit auf 42°C vorgewärmten Waschpuffer I (20xSSC, 10% SDS, Harnstoff, H₂O) inkubiert. Die Membran wurde aus dem Röhrchen genommen und in einer Schale mit 2xSSC bedeckt und für 2x5 min geschwenkt. Die Membran wurde nun für eine Minute mit 16 ml Detektionslösung bedeckt und dann in Klarsichtfolie gewickelt und ca. 30 Minuten auf einem Röntgenfilm in einer Exponierkassette belichtet und der Film anschließend im Entwickler (Curix 60, Agfa, Köln, Deutschland) entwickelt.

Zur Aufbewahrung der Membran schweißten wir diese zusammen mit der Detektionslösung ein. Sie kann dann zu einer Rehybridisierung wiederverwendet werden.

Definition der Verwandtschaft einzelner Isolate zueinander aufgrund der Ähnlichkeit des Bandenmusters:

Als höchstwahrscheinlich verwandt galten Isolate, deren Bandenmuster identisch war oder sich nur in ein oder zwei Banden unterschied. Als möglicherweise verwandt galten Isolate, die sich in mehr als zwei Banden voneinander unterschieden, deren Bandenmuster aber ähnlich war. Als nicht verwandt galten Isolate, die ein völlig unterschiedliches Bandenmuster aufwiesen.

III Ergebnisteil

1. Patientendaten

Im Laufe der Studie wurden 56 Mukoviszidose-Patienten mit Nachweis von Pilzen im Sputum oder tiefen Rachenabstrich der Universitäts-Kinderklinik Würzburg und des Missionsärztlichen Instituts in Würzburg untersucht. Es handelt sich um 27 weibliche und 29 männliche Patienten mit einer Altersverteilung von 1 Jahr bis 36 Jahren, der Altersdurchschnitt lag bei 15 Jahren.

Aus der Krankheitsgeschichte der Patienten wurden folgende Daten erhoben: Alter, Datum der Erstdiagnose, Typ der genetischen Mutation, bakterielle Besiedelung, Pilzbesiedelung und Art der antimykotischen Therapie.

Die einzelnen Angaben sind in Tabelle 2 aufgeführt

Tab. 2: Patientendaten

Nr	Alter	Diagnose	Mutation	Bakterielle Besiedelung	Pilz-Besiedelung	Antimykotika
1.	23	1981	ΔF508	<i>Serratia</i> spp, <i>Enterobacter</i> spp, <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>S. aureus</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>Scedosporium</i> spp, <i>Penicillium</i> spp	---
2.	19	1986	ΔF508	<i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. amnigenus</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>Neisseria</i> spp, <i>H. parainfluenzae</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. parapsilosis</i>	---
3.	9	1994	R117H heterozygot	<i>H. influenzae</i> , <i>Str. pyogenes</i> , <i>Neisseria</i> spp, <i>Serratia</i> spp, <i>H. parainfluenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>S. aureus</i>	<i>C. dubliniensis</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Rhodotorula</i> spp, <i>C. albicans</i>	---
4.	9	1992	ΔF508/1717-G→A	<i>S. aureus</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>Serratia</i> spp, <i>B. cepacia</i> , <i>St. liquefaciens</i> , <i>Enterobacter</i> spp	<i>Penicillium</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. pelliculosa</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. lusitaniae</i>	---
5.	8	1993	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterobacter</i> spp, <i>E. cloacae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Str. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>A. niger</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i>	---
6.	14	1991	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>A. fumigatus</i>	seit 04/00 ICZ
7.	16	1986	N1303K heterozygot	<i>S. aureus</i> , <i>Alcaligenes</i> spp, <i>Haemophilus</i> spp, <i>St. maltophilia</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
8.	8	1993	N1303K heterozygot	<i>S. aureus</i> , <i>Serratia</i> spp, <i>H. influenzae</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>H. parainfluenzae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>Penicillium</i> spp, <i>A. nidulans</i>	---
9.	28	1996	ΔF508/R334W	<i>P. aeruginosa</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
10.	5	1999	ΔF508	<i>H. parainfluenzae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	---
11.	13	1988	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	<i>Trichosporen</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. famata</i>	seit 12/99 ICZ
12.	13	1987	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Haemophilus</i> spp	<i>C. albicans</i>	---
13.	12	1989	ΔF508 heterozygot	<i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Haemophilus</i> spp	<i>A. flavus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Exophiala</i> spp	seit 06/01 ICZ
14.	24	1979	ΔF508 heterozygot	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas</i> spp, <i>H. influenzae</i>	<i>Phaeotryphomycet</i> , <i>Exophiala</i> spp, <i>Alternaria</i> spp, <i>C. albicans</i> , <i>Penicillium</i> spp	---
15.	18	1990	ΔF508	<i>Klebsiella</i> spp, <i>S. aureus</i> , gramneg. Stäbchen, <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>H. parainfluenzae</i>	<i>C. albicans</i>	---
16.	8	1993	N1303K	<i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>St. maltophilia</i>	<i>C. albicans</i> , <i>Penicillium</i> spp	---

		heterozygot <i>Se. marcescens</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. oxytoca</i>				
Nr	Alter	Diagnose	Mutation	Bakterielle Besiedelung	Pilz-Besiedelung	Antimykotika
17.	14	1989	n. b.	<i>K. oxytoca</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. albus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. cloacae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
18.	9	1994	ΔF508/ N1303K	<i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>Alkaligenes spp</i> , <i>Str. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> ,	<i>C. albicans</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>Tricho-</i> <i>derma spp</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Cladosporium spp</i>	---
19.	16	1990	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Haemophilus spp</i> , <i>Str. sanguis</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>Penicillium spp</i>	seit 06/01 ICZ
20.	16	1991	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
21.	19	1984	ΔF508	<i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae B</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>Neisseria spp</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
22.	1	2001	ΔF508	<i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i>	<i>C. albicans</i>	04/01 AMB
23.	11	1991	ΔF508/ G542X	<i>P. aeruginosa</i> , <i>H. influenzae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
24.	13	1992	ΔF508	<i>Neisseria spp</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Str. pyogenes</i> , <i>Haemophilus spp</i>	Hefen, <i>C. albicans</i> , Schimmelpilze	---
25.	14	1994	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Agrobacter radiobacter</i> , <i>Neisseria spp</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
26.	12	1989	ΔF508/ G542X	<i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Acinetobacter wolffii</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Flavimonas</i> <i>oryzihabitans</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>H. parainfluenzae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
27.	13	1995	ΔF508	<i>S. aureus</i> , <i>Acinetobacter spp</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Klebsiella spp</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. pelliculosa</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>A. fumigatus</i> <i>Aerobasidium pullulans</i> ,	---
28.	15	1986	ΔF508	<i>S. aureus</i> , <i>Serratia spp</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>Alkaligenes spp</i> , <i>Haemophilus spp</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Trichosporen</i>	---
29.	17	1986	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Cl. difficile</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Scedosporium</i>	12/99-05/00 ICZ 09/00 ICZ 11/00-07/01 ICZ
30.	3	1998	ΔF508	<i>Neisseria spp</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Serratia spp</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Pneumokokken</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Flavobacterium meningosepticum</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i>	<i>C. albicans</i>	---
31.	17	1983	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , Schimmelpilze	1999 ICZ
32.	26	1987	ΔF508/	<i>S. aureus</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Nocardia farcinia</i> , <i>H. influenzae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>	---

G551D

Nr	Alter	Diagnose	Mutation	Bakterielle Besiedelung	Pilz-Besiedelung	Antimykotika
33.	1	1999	G542x/ W1282x	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Flavobacterium spp</i>	<i>C. albicans</i>	---
34.	8	1994	ΔF508	<i>S. aureus</i> , <i>Pneumokokken</i> , <i>E. coli</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Streptokokken</i> , <i>Str. pyogenes A</i>	<i>C. albicans</i> , <i>Penicillium spp</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
35.	13	1998	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cepacia</i> , <i>Pneumokokken</i> , <i>Alkaligenes spp</i>	<i>C. albicans</i>	---
36.	6	1995	ΔF508/ G551	<i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	---
37.	13	1987	ΔF508 heterozygot	<i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
38.	9	1998	ΔF508/ N1303K	<i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Str. pyogenes A</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterokokken D</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Capnocytophaga spp</i> , <i>Bacteroides spp</i> , <i>H. parainfluenzae</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i>	11/00 AMB 12/00-02/01 ICZ
39.	9	1992	ΔF508	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Pneumokokken</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Exophiala</i> , <i>A. fumigatus</i> <i>Scedosporium</i>	9/98-3/99 ICZ seit 09/99 ICZ
40.	14	1987	ΔF508	<i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella spp</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Neisserien</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Chromobacter spp</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>gramneg. Stäbchen</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>E. dermatitidis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Enterobacter spp</i> , <i>Enterokokken spp</i> , <i>Bacteroides spp</i> , <i>Streptokokken F</i> , <i>Capnocytophaga spp</i> , <i>Pneumokokken</i> ,	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>P. notatum</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Phaeothryphomycet</i> , <i>A. odontolytica</i>	11/99-01/00 ICZ 12/00-02/01 ICZ 04/01 5FC, AMB
41.	17	1992	R553x/ 3849+10kbC-T	<i>S. aureus (ORSA)</i> , <i>Serratia spp</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>P. fluoreszens</i> , <i>B. cepacia</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>E. coli</i> , <i>Bacillus spp</i> , <i>Staphylokokken</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Acinetobacter spp</i> , <i>Chryseomonas spp</i> , <i>Flavobacterium spp</i> , <i>K. oxytoca</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Penicillium spp</i>	---
42.	9	1992	ΔF508	<i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Pneumokokken</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Haemophilus spp</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Exophiala spp</i>	---
43.	16	n.b.	n.b.	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Mycoplasmen spp</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
44.	7	1993	ΔF508	<i>E. coli</i> , <i>hämolyt. Streptokokken</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>gramnegative Nonfermenter</i> , <i>Flavobacterium spp</i> , <i>P. aureofaciens</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>Proteus vulgaris</i> ,	<i>Fusarium spp</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Penicillium spp</i> , <i>Rhodotorula spp</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. kefyri</i>	7/00 AMB 7/00-8/00 ICZ

Mycobacterium gordonae

Nr	Alter	Diagnose	Mutation	Bakterielle Besiedelung	Pilz-Besiedelung	Antimykotika
45.	35	1970	ΔF508	<i>P. alkaligenes</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
46.	32	1972	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>H. influenzae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>Cladosporien</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Penicillium spp</i>	---
47.	36	1995	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i>	---
48.	20	1981	n. b.	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i>	Schimmelpilze, <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i>	---
49.	31	1970	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>	---
50.	14	1986	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus (ORSA)</i> , <i>Enterokokken D</i> , <i>St. maltophilia</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Paecilomyces spp</i> , <i>C. albicans</i>	1999 AMB 02/00 AMB, 5FC
51.	12	1995	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus (ORSA)</i> , <i>Enterobacter spp</i> , <i>Comamonas spp</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>Pneumokokken</i> , <i>Alcaligenes spp</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>coliforme Keime</i>	<i>Penicillium spp</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Alternaria spp</i>	---
52.	18	1996	ΔF508 G551D	<i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>koag. neg. Staphylokokken</i> , <i>Enterobacter spp</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>MOTT</i> , <i>Streptokokken</i> , <i>B. cereus</i> , <i>St. maltophilia</i> , <i>Haemophilus spp</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>Exophiala spp</i> , <i>Phäothryphomycet</i> , <i>C. albicans</i>	---
53.	27	1975	ΔF508	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>MOTT</i> , <i>Mycobacterium chelanae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Haemophilus spp</i> , <i>E. coli</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>Hafnia alvei</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i>	---
54.	18	1986	n. b.	<i>P. aeruginosa</i> , β -hämolyisierende <i>Streptokokken</i> , <i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	---
55.	15	1988	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i> , <i>Penicillium spp</i>	---
56.	20	1984	ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus (ORSA)</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>C. albicans</i>	---

n. b.= nicht bekannt

ICZ = Itraconazol

AMB = Amphotericin B

5FC = Flucytosin

2. Isolate

2a) Speziesverteilung

Die Studie umfasst einen Gesamtzeitraum von 30 Monaten. In der Zeit vom 01.02.1999 bis 01.08.2001 wurden von den 56 Patienten insgesamt 422 *Candida*-Erreger aus Rachenabstrichen oder Sputen isoliert.

78,7% (332 Isolate) gehörten zur häufigsten *Candida*-Spezies *C. albicans*. 21,1% (89 Isolate) gehörten der non-*albicans Candida* Gruppe an. Ein Isolat wurde nicht näher bestimmt.

Zur non-*albicans Candida* Gruppe gehörten *C. parapsilosis* (20 Isolate), *C. glabrata* (31 Isolate), *C. dubliniensis* (22 Isolate), *C. tropicalis* (6 Isolate), *C. kefyr* (4 Isolate), *C. lusitaniae* (2 Isolate), *C. krusei* (2 Isolate), *C. rugosa* (1 Isolat), *C. pelliculosa* (1 Isolat). Die Abbildung 1 zeigt die Verteilung der *Candida*-Spezies aus der non-*albicans Candida* Gruppe:

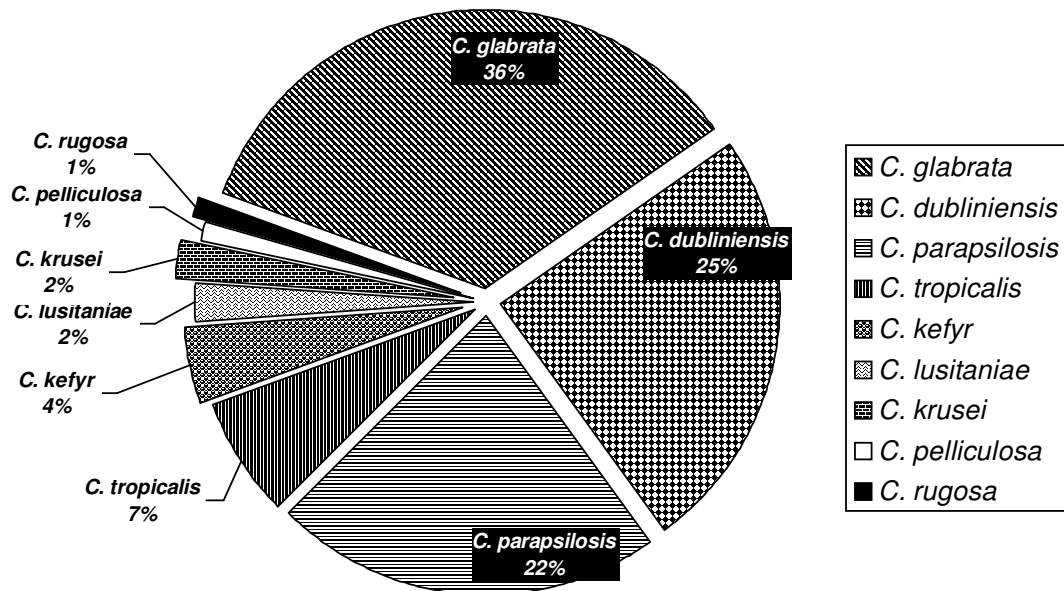


Abb. 1: Verteilung der non-*albicans Candida* Spezies

Bei den 56 Patienten war die Verteilung der *Candida*-Spezies wie folgt: bei 53 Patienten *C. albicans*, 9 *C. glabrata*, 7 *C. dubliniensis*, 6 *C. parapsilosis*, 2 *C. tropicalis*, 2 *C. kefyr*, 2 *C. lusitaniae*, jeweils 1 Patient *C. krusei*, *C. rugosa* und *C. pelliculosa*. Bei einem Patienten wurde die *Candida*-Spezies nicht näher bestimmt.

Die Abbildung 2 zeigt die Häufigkeit der einzelnen non-*albicans Candida* Spezies bezogen auf die Zahl der Patienten

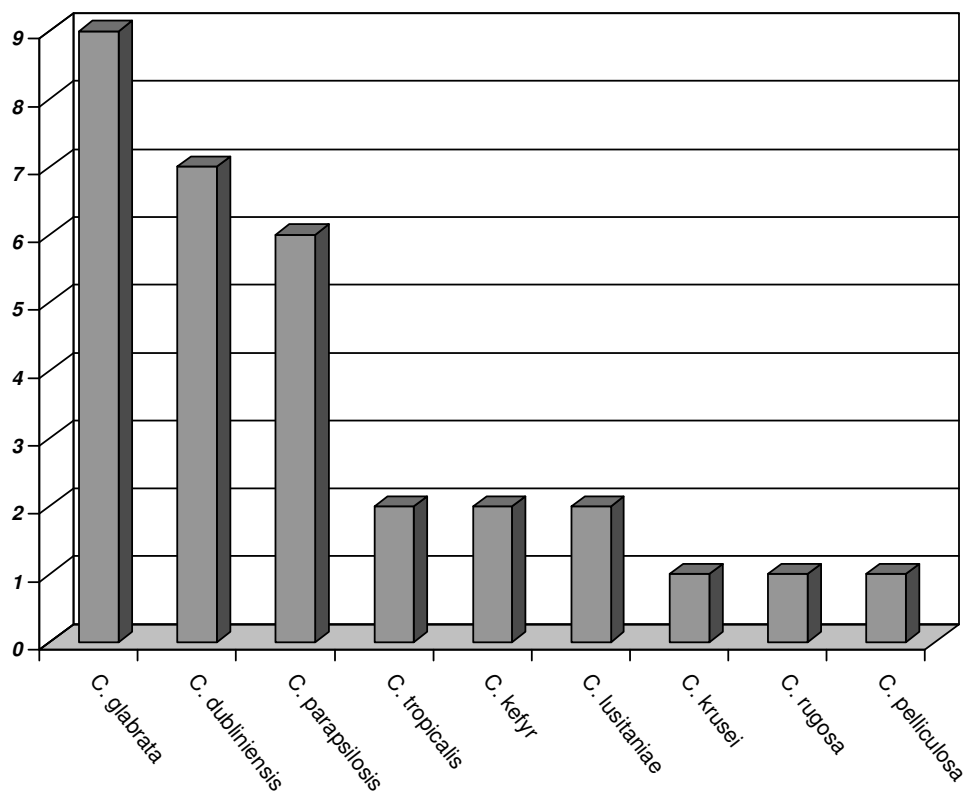


Abbildung 2: Verteilung der non-*albicans Candida* Spezies auf die Patienten

Manche Patienten waren während des Untersuchungszeitraums nur mit einer *Candida*-Spezies kolonisiert, bei anderen Patienten liessen sich im Verlauf des Untersuchungszeitraums mehrere *Candida*-Spezies isolieren.

Abbildung 3 zeigt die Häufigkeit von verschiedenen *Candida*-Spezies pro Patient.

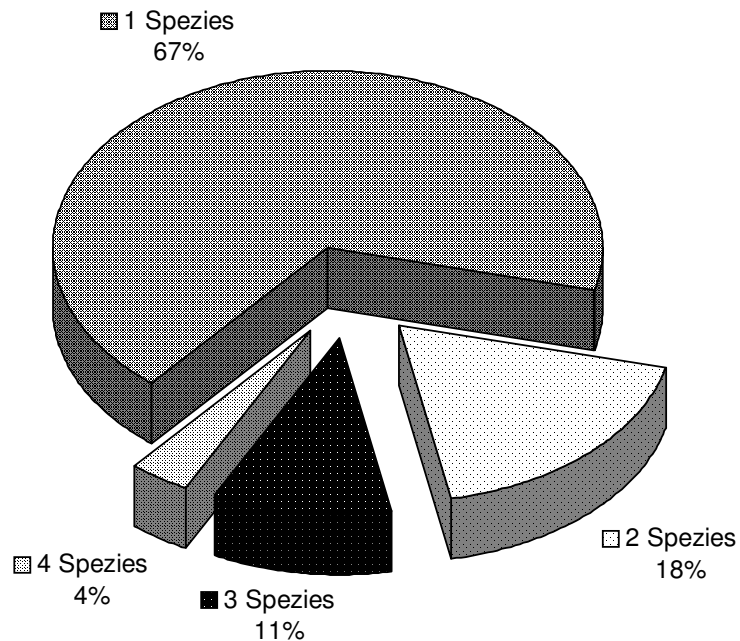


Abb. 3: Anzahl der *Candida*-Spezies pro Patient

2b) Persistenz der einzelnen *Candida*-Spezies

Für die einzelnen Patienten waren die Zeiträume, in denen die *Candida*-Spezies nachgewiesen wurden, unterschiedlich. Bei manchen konnte nur einmalig innerhalb des Untersuchungszeitraums eine bestimmte *Candida*-Spezies nachgewiesen werden, bei anderen Patienten persistierten die einzelnen Spezies über einen längeren Zeitraum. Die Tabelle 3 zeigt - bezogen auf die einzelnen *Candida*-Spezies - die Anzahl der Patienten mit nur einem Isolat, die Anzahl der Patienten mit mehreren Isolaten und den durchschnittlichen Zeitraum (in Monaten) in dem bei Patienten mit mehreren Isolaten dieselbe *Candida*-Spezies nachgewiesen werden konnte.

Tab. 3: Persistenz der einzelnen *Candida*-Spezies

	<i>C. alb</i>	<i>C. glab</i>	<i>C. dubl</i>	<i>C. trop</i>	<i>C. krus</i>	<i>C. para</i>	<i>C. lus</i>	<i>C. kefy</i>	<i>C. pell</i>	<i>C. rug</i>	<i>n.d.</i>
Pat mit nur 1 Isolat	8	4	3	1	---	3	2	---	1	1	1
Pat mit meh- reren Isolaten	45	5	4	1	1	3	---	2	---	---	---
Durchschnittl. Zeitraum in Mo	16,4	14,2	12	18	8	9	---	8,5	---	---	---

n.d. = nicht näher definierte *Candida*-Spezies

3. Ergebnisse der *in vitro* Antimykotika-Empfindlichkeitstestung

3a) *in vitro* Empfindlichkeit der einzelnen *Candida*-Spezies

Für jede *Candida*-Spezies wurde die *in vitro* Empfindlichkeit auf Amphotericin B (Ampho), 5-Flucytosin (5-FC), Fluconazol (Fluc), Itraconazol (Itra), Voriconazol (Vori) und Micafungin (Mica) bestimmt. Für die einzelnen Spezies mit mehr als 5 Isolaten wurden die MHK₉₀-Werte, die MHK₅₀-Werte, die Mittelwerte und der Range bestimmt. Diese sind in Tabelle 4 aufgeführt. Tabelle 5 gibt die Mittelwerte an für die selteneren *Candida*-Spezies mit weniger als 5 Isolaten. Die Werte wurden alle aus Doppelbestimmungen ermittelt.

Tab 4: *in vitro* Antimykotika-Empfindlichkeit der häufigeren *Candida*-Spezies

<i>C. albicans</i>						
n=263	Ampho	5FC	Fluc	Itra	Vori	Mica
MHK ₉₀	0,5	1	1	0,12	0,03	1
MHK ₅₀	0,5	0,25	0,25	0,06	0,03	0,5
Mittelwert	0,4	0,7	6,3	0,2	0,6	0,6
Range	0,12-1	0,03-32	0,12->128	0,03->4	0,03->16	0,12-2

<i>C. dubliniensis</i>						
n=19	Ampho	5FC	Fluc	Itra	Vori	Mica
MHK ₉₀	0,5	0,12	0,5	0,12	0,03	1
MHK ₅₀	0,3	0,06	0,3	0,06	0,03	1
Mittelwert	0,31	0,05	0,30	0,07	0,03	0,83
Range	0,12-1	0,03-0,25	0,12-0,5	0,03-0,12	0,03	0,5-2

<i>C. glabrata</i>						
n=24	Ampho	5FC	Fluc	Itra	Vori	Mica
MHK ₉₀	1	0,12	32	1	0,12	0,5
MHK ₅₀	0,5	0,06	8	0,25	0,03	0,25
Mittelwert	0,5	0,2	11,1	0,4	0,05	0,4
Range	0,12-1	0,03-0,5	0,25-32	0,03-1	0,03-0,12	0,12-1

<i>C. parapsilosis</i>						
n=13	Ampho	5FC	Fluc	Itra	Vori	Mica
MHK ₉₀	0,5	0,12	1	0,06	0,03	8
MHK ₅₀	0,5	0,06	0,5	0,03	0,03	4
Mittelwert	0,4	0,06	0,4	0,04	0,03	5,7
Range	0,12-1	0,03-0,12	0,12-1	0,03-0,06	0,03	2-8

<i>C. tropicalis</i>						
n=6	Ampho	5FC	Fluc	Itra	Vori	Mica
MHK ₉₀	1	0,25	>128	>4	>16	1
MHK ₅₀	0,5	0,12	>128	4	0,5	0,5
Mittelwert	0,6	0,2	203,2	3,8	5,5	0,5
Range	0,5-1	0,06-0,25	2->128	0,5->4	0,12->16	0,25-1

Tab 5: *in vitro* Antimykotika-Empfindlichkeit der selteneren *Candida*-Spezies

Spezies	Isolate	Ampho	5FC	Fluc	Itra	Vori	Mica
<i>C. lusitaniae</i>	2	0,7	0,03	0,3	0,1	0,03	1,1
<i>C. kefyr</i>	3	0,5	1,4	0,6	0,1	0,03	1,3
<i>C. krusei</i>	2	0,6	36	40	0,4	0,5	0,8
<i>C. pelliculosa</i>	1	0,3	0,03	4	0,1	0,1	0,5
<i>C. rugosa</i>	1	0,5	0,1	0,1	0,03	0,03	0,5

3b) Erhöhte Werte bei *der in vitro* Antimykotika-Empfindlichkeitstestung:

Einige Isolate wiesen erhöhte MHK-Werte gegen bestimmte Medikamente bei der *in vitro* Empfindlichkeitstestung auf. Bei einigen Spezies der non-*albicans* *Candida* spp. liegt eine natürliche Resistenz gegen einige Medikamente vor. So waren z. B. beide *C. krusei*-Isolate gegen Flucytosin und Fluconazol resistent, desweiteren zeigten sich auch gegen Voriconazol erhöhte MHK-Werte, sowie bei Itraconazol leicht erhöhte MHK-Werte, die sich jedoch noch im dosisabhängig-empfindlichen Bereich befanden.

Fünf der sechs untersuchten *C. tropicalis*-Isolate waren resistent gegen die Azole Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol, ein Isolat zeigte erhöhte MHK-Werte für Fluconazol, jedoch noch im sensiblen Bereich.

Von den 24 untersuchten *C. glabrata*-Isolaten zeigten 20 Isolate erhöhte MHK-Werte gegenüber Fluconazol. 8 dieser Isolate waren auch gegen Itraconazol, jedoch nicht gegen Voriconazol vermindert sensibel.

Das eine untersuchte *C. pelliculosa*-Isolat zeigte erhöhte MHK-Werte gegenüber Fluconazol, jedoch befanden sich diese noch im sensiblen Bereich.

Gegen Micafungin zeigten alle Isolate der Spezies *C. parapsilosis* erhöhte MHK-Werte.

Aus der *C. albicans*-Gruppe zeigten 10 Isolate erhöhte MHK-Werte gegen Flucytosin. Neun davon stammten von demselben Patienten (Patient A) Dieser Patient wurde vor und während des Untersuchungszeitraums nicht antimykotisch behandelt.

Tabelle 6 zeigt die einzelnen *C. albicans*-Isolate von Patient A und deren Werte für Flucytosin in chronologischer Reihenfolgeder Probeentnahme im Vergleich mit den Ergebnissen der molekularen Typisierung.

Tab. 6: *C. albicans*-Isolate eines Patienten mit erhöhten Flucytosin-Werten

Isolat	Entnahmedatum	MHK Flucytosin	Genotyp
A1	16.08.00	8/4/8	a1
A2	08.09.00	8/16/32	a2, hw.v. mit a1
A3	14.09.00	8/16/32	a3, hw.v. mit a1
A4	15.11.00	16/16	a4, hw.v. mit a1
A5	19.01.01	8/16/32	a5
A6	16.03.01	8/16	a5
A7	14.04.01	16/16	a1*
A8	06.06.01	2/4	a6, hw.v. mit a1
A9	11.06.01	4/8	a7, hw.v. mit a1
A10	05.07.01	4/8	a8, hw.v. mit a1

hw.v. = höchstwahrscheinlich verwandt * Blot nur eingeschränkt beurteilbar, da nur schwache Banden

Acht von zehn Isolaten dieses Patienten zeigen starke Ähnlichkeiten im Bandenmuster (Bandenmuster a1) und sind nur durch das Fehlen oder Vorhandensein einzelner Banden zu unterscheiden. Sie sind als höchstwahrscheinlich miteinander verwandt anzusehen.

Zwei Isolate (A5, A6) zeigen ein vom Typ a1 durch mehr als 2 Banden abweichendes Bandenmuster a5.

Patient (Patient B) wies fünf Isolate von *C. albicans* auf, die gegenüber Fluconazol erhöhte bzw. resistente MHK-Werte hatten. Diese Isolate zeigten desweiteren eine Kreuzresistenz gegen Itraconazol und vier der fünf Isolate zusätzlich eine Kreuzresistenz gegen Voriconazol. Die anderen drei Isolate dieses Patienten zeigten leicht erhöhte Werte gegen Fluconazol und Itraconazol auf. Auch dieser Patient wurde vor und während des Untersuchungszeitraums nicht mit Antimykotika behandelt.

Tabelle 7 zeigt die einzelnen *C. albicans*-Isolate von Patient B und deren Werte für Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol in chronologischer Reihenfolge der Probenentnahme. Auch hier wurde Bezug auf die Ergebnisse der molekularen Typisierung genommen.

Die einzelnen MHK-Werte wurden doppelt bestimmt. Beide Werte sind in den Tabellen aufgeführt.

Tab. 7: *C. albicans*- Isolate eines Patienten mit erhöhten Azol-Werten

Isolat	Entnahmedatum	MHK Fluc	Itra	Vori	Genotyp
B1	12.07.99	>128/>128	>4/4	>16/>16	b1
B2	19.07.99	16/8	1/0,5	0,12/0,12	b1
B3	25.08.99	8/8	1/1	0,03/0,03	b1
B4	Jan 00	>128/>128	>4/>4	>16/16	b2, hw.v. mit b1
B5	16.06.00	8/4	0,25/0,12	0,03/0,03	b1
B6	17.07.00	>128/128	>4/4	0,25/0,25	b3, hw.v. mit b1
B7	28.08.00	>128/>128	>4/>4	>16/16	b4
B8	10.10.00	>128/>128	>4/>4	>16/16	b5 hw.v. mit b1

Hw.v.= höchstwahrscheinlich verwandt

Auch hier unterscheiden sich die einzelnen Isolate des Patienten nur durch ein oder zwei Banden im Bandenmuster und galten somit als höchstwahrscheinlich verwandt.

3c) Patienten mit Antimykotikabehandlung

12 der 56 untersuchten Patienten erhielten vor oder während des Untersuchungszeitraums Antimykotika. Davon wurden 7 Patienten mit Itraconazol behandelt, ein Patient bekam Amphotericin B, 2 Patienten wurden mit Itraconazol und Amphotericin B behandelt. Bei einem Patient wurde Amphotericin B und Flucytosin gegeben und 1 Patient bekam sowohl Itraconazol und Flucytosin als auch Amphotericin B.

Die Tabelle 8 zeigt die einzelnen Patienten, den Zeitraum und die Art der Antimykotikabehandlung, sowie ein Vergleich der Isolate vor und nach, bzw. während der Therapie, bezüglich Resistenz und Genstruktur. Die MHK-Werte in der Tabelle beziehen sich auf das jeweils verwendete Medikament. Lagen mehr als ein Isolat vor oder nach Antimykotikagabe vor, so wurde für diese der Mittelwert der einzelnen MHK-Werte bestimmt.

Wie man aus der Tabelle ersehen kann fand meist unter Antimykotikabehandlung eine Änderung der mykotischen Schleimhautbesiedelung statt. Bei vier Patienten wurde nach antimykotischer Behandlung keine *Candida*-Spezies mehr isoliert. Bei einem Patienten fand ein Wechsel von *C. albicans* und *C. parapsilosis* zu *C. glabrata* unter Antimykotikagabe statt. Drei Patienten waren weiterhin mit *C. albicans* kolonisiert.

Bei vier Patienten konnten keine *Candida*-Isolate vor Beginn der Antimykotikabehandlung isoliert werden, so dass hier kein Vergleich vorgenommen werden konnte.

Bei keinem der Patienten konnte sicher die Entwicklung einer Resistenz unter Antimykotikatherapie dokumentiert werden.

Tab. 8: Patienten mit Antimykotikatherapie

Pat.	Dauer und Art der Antimykotikagabe	Zahl und Art der Isolate vor während/nach Antimykotikagabe		in-vitro-Empfindlichkeit vor während/nach Antimykotikagabe		Genotypen vor während/nach Antimykotikagabe	
6	16 Monate ICZ	1 alb	---	0,12	---	1	---
		1 trop	---	2	---	1	---
		1 dubl.	---	0,12	---	1	---
11	20 Monate ICZ	1 alb	1 alb	0,12	0,12	unterschiedliche Isolate	
13	2 Monate ICZ	5 alb	---	0,28	---	4	---
19	2 Monate ICZ	4 alb	---	0,11	---	1	---
		4 para	---	0,05	---	4	---
		---	1 glab	---	0,25	---	1
22	4 Monate AMB	5 alb	---	0,5	---	1	---
29	insg. 14 Monate ICZ	---	6 alb	---	0,08	---	2, verwandt
38	1 Monat AMB	5 alb	2 alb	1	***	1	***
	2 Monate ICZ	5 alb	2 alb	0,09	***	1	***
39	insg. 29 Monate ICZ	---	11 alb	---	0,35	---	2
		---	7 glab	---	0,45	---	4
44	1 Monat AMB	---	2 kefyr	---	0,88	---	1
		---	1 glab	---	0,5	---	1
	2 Monate ICZ	---	2 kefyr	---	0,22	---	1
		---	1 glab	---	0,12	---	1
50	insg. 2 Monate AMB	6 alb	---	0,875	---	3	---
	1 Monat 5 FC	6 alb	---	0,24	---	3	---
40	insg. 4 Monate ICZ	6 alb	7 alb	0,04	***	3	***
		5 para	---	0,03	---	2	---
	1 Monat 5FC	13 alb	7 alb	0,19	***	7	***
		5 para	---	0,08	---	2	---
	1 Monat AMB	13 alb	7 alb	0,47	***	7	***
5 para	---	---	0,55	---	2	---	
31	4 Monate ICZ	---	5 alb	---	0,05	---	4, verwandt

*** nicht bestimmt

4. Ergebnisse der molekularen Typisierung:

4a) Chronologischer Isolatevergleich eines Patienten

Die verschiedenen Isolate eines Patienten wurden durch molekulare Typisierung hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit zueinander untersucht. Dabei wurde die Zahl der unterschiedlichen Genotypen bestimmt und Aussagen über deren Ähnlichkeit, bzw. Verwandtschaft der einzelnen Isolate zueinander gemacht.

Für die Isolate der *Candida albicans*-Gruppe umfasste die molekulare Typisierung die Hybridisierung mittels CARE2-Sonde und einer RAPD-PCR mit dem RPO2-Primer. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

6 Patienten hatten jeweils nur ein *C. albicans* Isolat, so dass hier kein Verwandtschaftsvergleich in der Typisierung vorgenommen werden konnte.

Aus Tabelle 9 geht nicht nur eine auffallend hohe Ähnlichkeit in den Bandenmustern hervor, sondern auch (bis auf wenige Ausnahmen) die bessere Diskriminationsfähigkeit der Southern-Hybridisierung gegenüber der RAPD-PCR. Dies zeigt sich daran, dass in den meisten Fällen bei der Hybridisierung die Zahl unterschiedlicher Bandenmuster größer war, als bei der RAPD-PCR.

Tab 9: Molekulare Typisierung der *Candida albicans*-Isolate

Patient	Zeitraum	Isolate	Zahl der Genotypen		höchstwahrscheinlich verwandt	möglicherweise verwandt	nicht verwandt
			Care2	RAPD			
31	12 Monate	5 <i>alb</i>	4	4	3	---	2
6	20 Monate	4 <i>alb</i>	3	1	4	---	---
2	20 Monate	10 <i>alb</i>	6	2	7+2	1	---
22	1 Monat	5 <i>alb</i>	1	1	5	---	---
9	29 Monate	7 <i>alb</i>	6	4	4+3	---	---
5	22 Monate	2 <i>alb</i>	2	1	---	2	---
11	16 Monate	2 <i>alb</i>	2	2	---	2	---
40	20 Monate	13 <i>alb</i>	4*	2	11+2	---	---
37	2 Monate	2 <i>alb</i>	1	2	2	---	---
12	7 Monate	2 <i>alb</i>	2*	2	---	---	2
29	7 Monate	6 <i>alb</i>	2	2	5	1	---
1	19 Monate	12 <i>alb</i>	7	2	11	---	1
48	25 Monate	4 <i>alb</i>	2	1	4	---	---
36	7 Monate	5 <i>alb</i>	5	2	2	3	---
20	20 Monate	4 <i>alb</i>	4	2	2	2	---
19	10 Monate	5 <i>alb</i>	1*	2	5	---	---
18	12 Monate	10 <i>alb</i>	6	3	3+2+2	3	---
49	2 Monate	2 <i>alb</i>	1*	1	2	---	---
23	4 Monate	2 <i>alb</i>	2	2	2	---	---
39	13 Monate	10 <i>alb</i>	2	2	9	1	---
47	16 Monate	2 <i>alb</i>	1	1	2	---	---
7	25 Monate	14 <i>alb</i>	7	2	6	6	2
16	10 Monate	4 <i>alb</i>	2	1	4	---	---
8	5 Monate	3 <i>alb</i>	1	2	3	---	---
51	20 Monate	4 <i>alb</i>	3	2	3	---	1
32	20 Monate	7 <i>alb</i>	6	1	7	---	---
24	12 Monate	4 <i>alb</i>	2	2	3	---	1
41	19 Monate	13 <i>alb</i>	5	3	12	---	1
46	21 Monate	3 <i>alb</i>	2	1	2	1	---
45	4 Monate	2 <i>alb</i>	2	1	---	---	2
52	9 Monate	2 <i>alb</i>	2	2	---	---	2
26	19 Monate	5 <i>alb</i>	1	1	5	---	---
25	9 Monate	2 <i>alb</i>	2	1	2	---	---
14	10 Monate	5 <i>alb</i>	2*	3	5	---	---
27	6 Monate	4 <i>alb</i>	1*	1	4	---	---
34	3 Monate	2 <i>alb</i>	2	2	---	2	---
50	9 Monate	6 <i>alb</i>	3	1	6	---	---
15	3 Monate	2 <i>alb</i>	1*	1	2	---	---
55	3 Monate	2 <i>alb</i>	1	1	2	---	---
54	9 Monate	7 <i>alb</i>	2	3	4+3	---	---
53	11 Monate	4 <i>alb</i>	4	1	---	4	---
30	19 Monate	2 <i>alb</i>	1	1	2	---	---
35	7 Monate	7 <i>alb</i>	1	1	7	---	---
38	16 Monate	5 <i>alb</i>	1	1	5	---	---
28	22 Monate	12 <i>alb</i>	6	4	8	2	2

* Blot nur eingeschränkt beurteilbar

Für die Isolate aus der non-*albicans Candida* Gruppe wurde die RAPD-PCR durchgeführt. Diese Ergebnisse zeigt Tabelle 10.

Tab 10: Molekulare Typisierung der non-*albicans* Isolate

Name	Zeitraum	Isolate	Zahl der Genotypen	höchstwahrsch. verwandt	möglicherweise verwandt	nicht verwandt
2	13 Monate	5 <i>glab</i>	4	2	3	---
5	16 Monate	6 <i>glab</i>	3	3	3	---
39	13 Monate	6 <i>glab</i>	4	6	---	---
18	8 Monate	2 <i>glab</i>	1	2	---	---
56	1 Tag	2 <i>glab</i>	1	2	---	---
3	7 Monate	4 <i>dubl</i>	1	4	---	---
5	20 Monate	5 <i>dubl</i>	2	4	1	---
4	1 Monat	3 <i>dubl</i>	2	2	1	---
2	13 Monate	6 <i>para</i>	3	5	1	---
40	5 Monate	6 <i>para</i>	3	4	2	---
19	9 Monate	5 <i>para</i>	4	5	---	---
5	18 Monate	5 <i>trop</i>	1	5	---	---
1	4 Monate	2 <i>kefyr</i>	1	2	---	---
44	1 Monat	2 <i>kefyr</i>	1	2	---	---
5	8 Monate	2 <i>krusei</i>	1	2	---	---

Bei jeder Typisierung wurde eine Kontrolle (siehe Tabelle 1) mitbestimmt, die sich jeweils von den anderen Bandenmustern unterschied, in der Bestimmung der unterschiedlichen Genotypen der Tabellen aber nicht aufgeführt ist. Lediglich bei *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa* und *C. rugosa* wurden keine Kontrollen mitgeführt.

Bei mehreren Patienten wurde nur ein Isolat untersucht, so dass hier kein Verwandtschaftsvergleich unternommen werden konnte: 3 Patienten hatten nur ein *C. glabrata*-Isolat, 2 Patienten hatten nur ein *C. lusitaniae*-Isolat. Bei 4 Patienten wurde nur ein *C. dubliniensis*-Isolat untersucht. Ein Patient hatte nur ein *C. tropicalis*-Isolat. Nur einen *C. parapsilosis*-Stamm wiesen 4 Patienten auf. Auch *C. rugosa* und *C. pelliculosa* kamen nur einmal vor. Diese wurden nicht in der Typisierungstabelle aufgeführt.

4b) Persistenz von höchstwahrscheinlich verwandten *Candida albicans*-Stämmen

Ausgehend von den Ergebnissen der Molekularen Typisierung konnte die Persistenz einzelner isogenetischer Stämme (das heißt höchstwahrscheinlich verwandter Isolate) bestimmt werden. Die Persistenz von einzelnen isogenetischen *C. albicans*-Stämmen bei Patienten mit mehreren Isolaten zeigt Tabelle 11.

Tab 11: Persistenz von höchstwahrscheinlich verwandten *Candida albicans*-Stämmen

Pat.	untersuchter	Höchstwahrscheinlich verwandte Isolate		
	Zeitraum	Isolate gesamt	Anzahl	längster Zeitraum
31	12 Monate	5	3	12 Monate
13	20 Monate	4	4	20 Monate
2	20 Monate	10	7	20 Monate
22	1 Monat	5	5	1 Monat
9	29 Monate	7	4	17 Monate
5	22 Monate	2	0	keine Persistenz
11	16 Monate	2	0	keine Persistenz
40	20 Monate	13	11	20 Monate
37	2 Monate	2	2	2 Monate
12	7 Monate	2	0	keine Persistenz
29	7 Monate	6	5	6 Monate
1	19 Monate	12	11	19 Monate
48	25 Monate	4	4	25 Monate
36	7 Monate	5	2	2 Monate
20	20 Monate	4	2	3 Monate
19	10 Monate	5	5	10 Monate
18	12 Monate	10	3	12 Monate
49	2 Monate	2	2	2 Monate
23	4 Monate	2	2	4 Monate
39	13 Monate	10	9	12 Monate
47	16 Monate	2	2	16 Monate
7	25 Monate	14	6	24 Monate
16	10 Monate	4	4	10 Monate
8	5 Monate	3	3	5 Monate
51	20 Monate	4	3	13 Monate
32	20 Monate	7	7	20 Monate
24	12 Monate	4	3	6 Monate
41	19 Monate	13	12	19 Monate
46	21 Monate	3	2	6 Monate
45	4 Monate	2	0	keine Persistenz
52	9 Monate	2	0	keine Persistenz
26	19 Monate	5	5	19 Monate
25	9 Monate	2	2	9 Monate
14	10 Monate	5	5	10 Monate
27	6 Monate	4	4	6 Monate
34	3 Monate	2	0	keine Persistenz
50	9 Monate	6	6	9 Monate
15	3 Monate	2	2	3 Monate
55	3 Monate	2	2	3 Monate
54	9 Monate	7	4	9 Monate
53	11 Monate	4	0	keine Persistenz
30	19 Monate	2	2	19 Monate
35	7 Monate	7	7	7 Monate
38	16 Monate	5	5	16 Monate
28	22 Monate	12	8	22 Monate

Bei 38 von insgesamt 45 Patienten mit mehreren *Candida albicans*-Isolaten zeigte sich eine Persistenz isogenetischer Stämme (d. h. höchstwahrscheinlich verwandte Isolate waren über einen längeren Zeitraum nachweisbar). Dies ergibt eine Persistenz eines bestimmten Stammes bei 84% der Patienten mit mehreren Isolaten von *Candida albicans*. Der durchschnittliche Zeitraum der Persistenz betrug 9,73 Monate.

4c) Geschwistervergleich

Unter den Patienten befinden sich auch zwei Geschwisterpaare (Pat. Nr. 6 + 5, sowie Pat. Nr. 35 + 30) und ein Geschwistertrio (Pat. 7, 8 + 16). Gerade das Geschwistertrio ist interessant, da sich darunter Zwillinge befinden. Wir untersuchten, ob sich Ähnlichkeiten im Bandenmuster der Isolate bei den einzelnen Geschwisterteilen fanden. Tabelle 12 zeigt die Zahl der Isolate und der unterschiedlichen Genotypen für jedes Geschwisterteil und den Verwandtschaftsgrad der Isolate beider Geschwister. Dabei wurden immer die beiden Teile eines Geschwisterpaares nebeneinander gestellt. Bei dem Geschwistertrio wurde erst der ältere Bruder mit der einen Zwillingsschwester, dann mit der anderen Zwillingsschwester und zuletzt beide Zwillinge miteinander verglichen.

Zur Bestimmung der Genotypenzahl wurde jeweils das aussagekräftigste Verfahren, das ist bei *C. albicans*-Stämmen die Southern-Hybridisierung, bei non-*albicans Candida* Isolaten die RAPD-PCR verwendet.

Tab. 12: Geschwistervergleich

Pat-Nr.	Zahl der Isolate	Genotypen	Pat-Nr.	Zahl der Isolate	Genotypen	Zahl der Isolate die im Vergleich der Geschwister zueinander höchstwahrscheinlich möglicherweise verwandt sind	
6	1 <i>alb</i>	1	5	2 <i>alb</i>	2	---	---
6	1 <i>dubl</i>	1	5	5 <i>dubl</i>	2	5	1
6	1 <i>trop</i>	1	5	5 <i>trop</i>	1	6	---
35	7 <i>alb</i>	1*	30	2 <i>alb</i>	1*	9*	---
7	14 <i>alb</i>	7	16	4 <i>alb</i>	2	3	---
7	14 <i>alb</i>	7	8	3 <i>alb</i>	1	5	---
7	1 <i>dubl</i>	1	8	1 <i>dubl</i>	1	---	2
16	4 <i>alb</i>	2	8	3 <i>alb</i>	1	4	3

* Blot eingeschränkt beurteilbar

5. *Candida dubliniensis* bei Mukoviszidose-Patienten

Besonderes Augenmerk wurde auf die erst vor einigen Jahren entdeckte Spezies *C. dubliniensis* bei dieser Population gelegt.

Häufigkeit: *C. dubliniensis* wurde bei 7 von 56 CF-Patienten gefunden und war mit 22 von insgesamt 422 Isolaten die dritthäufigste isolierte Spezies nach *C. albicans* und *C. glabrata*.

Persistenz: Von 7 Patienten mit *C. dubliniensis* konnte diese Spezies bei 4 Patienten mehrfach isoliert werden. Der durchschnittliche Zeitraum, in dem *C. dubliniensis* nachgewiesen werden konnte, betrug 12 Monate.

Resistenz: Die untersuchten Isolate zeigten sich auf alle sechs getesteten Antimykotika sensibel.

Molekulare Typisierung: Bei 3 der 7 Patienten, bzw. bei 11 von 22 Isolaten waren bei der Southern-Hybridisierung mit CARE-2-Sonde einige schwache Banden sichtbar. Bei 4 Patienten zeigte sich kein Signal. *C. dubliniensis* ist eine Spezies, die morphologisch eng mit *C. albicans* verwandt ist und oft auch mit dieser verwechselt wird. Bei der *C. albicans*-spezifischen Hybridisierung mit CARE-2 fanden sich in einigen Fällen schwache Banden, dies könnte darauf hinweisen, dass es evtl. zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* Übergänge gibt. 7 der 22 untersuchten Isolate wurden phänotypisch (Untersuchung mittels CHROM-Agar) als *C. albicans* identifiziert und wurden erst durch Molekulare Typisierung über die CARE-2-Hybridisierung oder durch Anzucht auf Staib-Agar als *C. dubliniensis* erkannt.

Häufigkeit bei Geschwisterpaaren: bei zwei Geschwisterpaaren wurde jeweils *C. dubliniensis* nachgewiesen. 4 der 7 von *C. dubliniensis* besiedelten Patienten hatten ein Geschwisterteil, bei dem sich ebenfalls *C. dubliniensis* isolieren ließ.

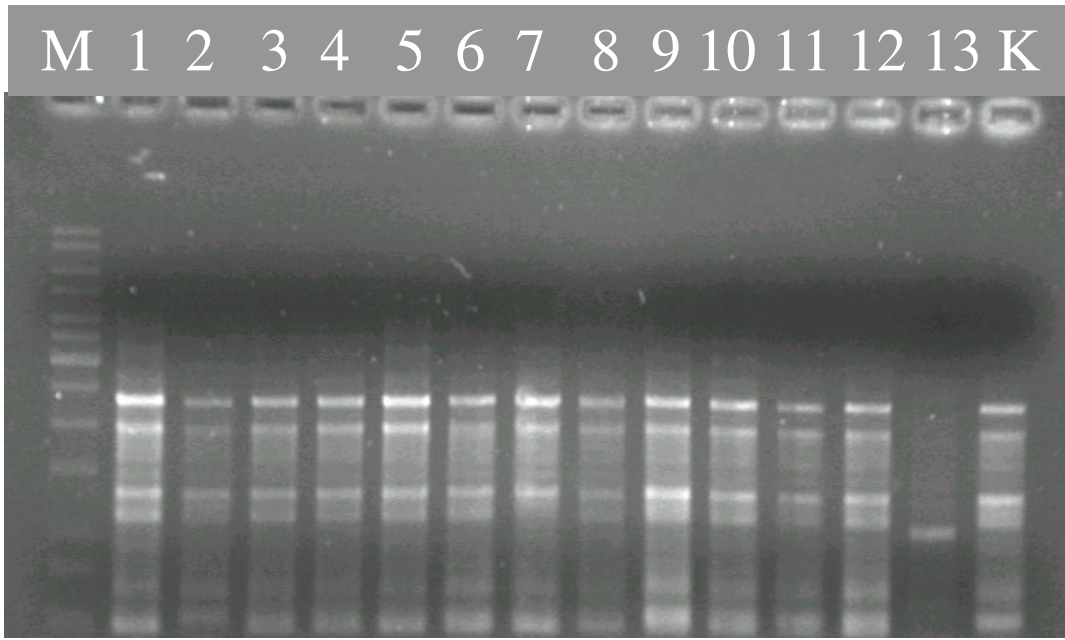


Abbildung 1: RAPD-Differenzierung von *Candida albicans* und *C. dubliniensis*

Abbildung 1 und 2: Isolate von Patient Nr. 1, gesammelt im Zeitraum Feb. 99 bis Aug. 00, 1-12 = *C. albicans*, 13= *C. dubliniensis*, K= Kontrolle, M= Marker

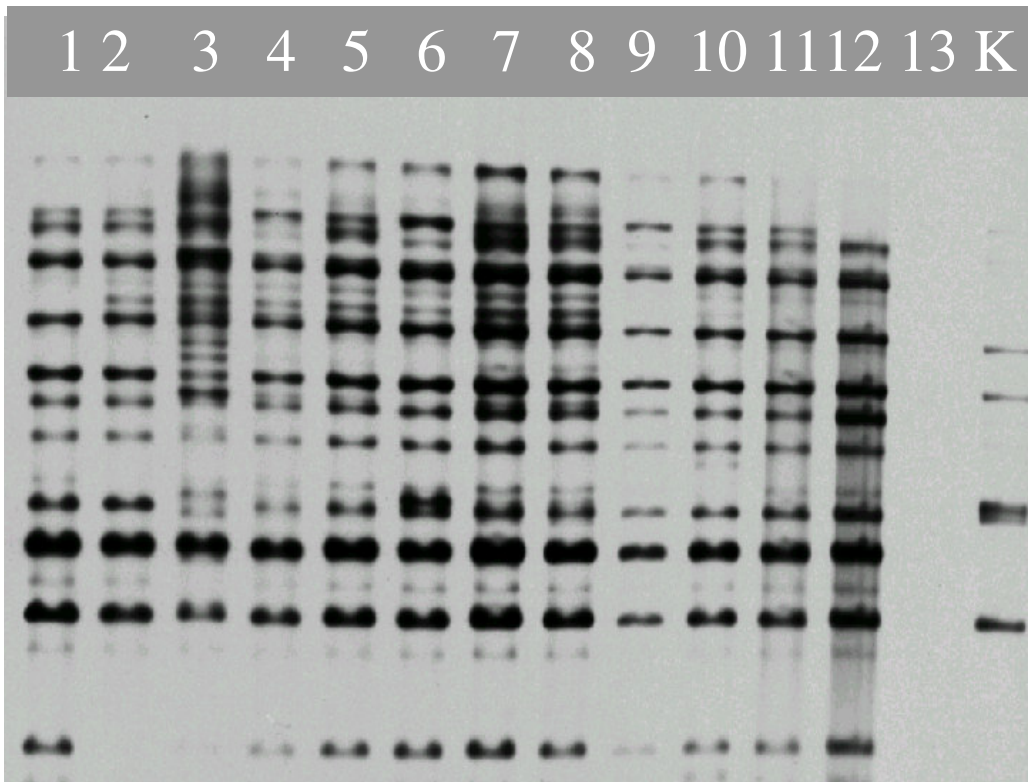


Abbildung 2: CARE2-Differenzierung von *Candida albicans* und *Candida dubliniensis*

IV. Diskussionsteil:

Bei Mukoviszidose-Patienten hat die Kolonisation und Infektion des Respirationstraktes mit Bakterien und Pilzen eine besondere Bedeutung. Das visköse Sputum ist ein geeigneter Nährboden für die Besiedelung mit Bakterien und anderen Krankheitserregern, wie z. B. Pilzen. Auch wenn der Nutzen der intensiven antibiotischen Behandlung bei der CF gut belegt ist, so erhöht diese doch auch das Risiko der Entwicklung von Pilzkolonisation und -infektion (20). Gerade durch regelmäßige und lang andauernde Antibiotikabehandlung aufgrund bakterieller Besiedelung des Respirationstraktes hat sich hier eine Nische für pilzliche Spezies geöffnet. So gilt *C. albicans* mittlerweile als zweithäufigster Mikroorganismus bei der Mukoviszidose (3). Oft handelt es sich hierbei um eine chronische Besiedelung (19). Auch die Patienten dieser Studie wiesen häufig eine chronische Besiedelung der Atemwege mit *Candida* spp. auf. Auch hier handelte es sich ganz überwiegend um *C. albicans* (95% der Patienten waren mit *Candida albicans* besiedelt).

Auch die feuchte Umgebung, z. B. durch regelmäßige Nassinhalations- und Verneblungstherapien und die chronische Inflammation der Lunge, die mit dem Fortschreiten der Mukoviszidose einhergeht, sind begünstigende Faktoren für eine Pilz-Kolonisation (14). Burns et al. zeigten in einer Studie, daß die regelmäßige Inhalation von Tobramycin zu vermehrter Isolierung von *C. albicans* und *Aspergillen* führte (8). Desweiteren ist das Risiko für eine Mykose signifikant erhöht bei gewissen therapeutischen Maßnahmen, die bei verschlechtertem Krankheitsbild erforderlich sind, wie z. B. chirurgisch implantierte zentrale Venenkatheter (Port, Hickman etc.) (4), parenterale Hyperalimentation oder längerfristige topische und systemische Kortikoidgaben (20) oder andere Immunsuppressiva.

Die Bedeutung der Kolonisation mit Hefen und das Risiko, eine Pilzinfektion bei Mukoviszidose zu entwickeln, sind bisher noch zu wenig untersucht. Przyklenk et al., die den Anstieg von spezifischen IgG-Antikörpern in Bezug zum Auftreten von *Candida* untersuchten, kommen aufgrund der signifikant erhöhten Antikörper-Titer

gegen *C. albicans* bei CF-Patienten zu dem Schluss, dass die klinische Bedeutung von *C. albicans* bei CF-Patienten unterschätzt wird (34).

Welche klinische Relevanz der Nachweis pilzlicher Spezies im Sputum hat, ist bis heute noch nicht geklärt. Es wurde jedoch schon ein paralleler Trend zwischen dem Vorkommen von Pilzen und der Progression der Erkrankung bei Mukoviszidose aufgezeigt (5). So lag z. B. in einer Studie von Blaschke-Hellmessen et al. eine Kolonisation mit *C. albicans* bei Kindern mit mittelschweren, schweren oder letalen Verläufen, signifikant häufiger vor als bei Kindern mit leichtem Verlauf der Mukoviszidose. Mit der Schwere der pulmonalen Veränderungen stieg auch die Häufigkeit pathologischer mykologischer Befunde an (5). Auch Galant et al. sahen einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von erhöhten Präzipitat-Werten von *C. albicans* und einer verschlechterten Klinik, bzw. verschlechterten Röntgen-Scores bei Mukoviszidose-Patienten (14).

Maiz et al. dagegen stellten zwar eine hohe Prävalenz von Kolonisation und Sensibilisierung gegenüber *Candida* und *Aspergillen* bei Mukoviszidose fest, sahen aber keinen Zusammenhang dieser Sensibilisierung mit der Schwere der Erkrankung (24).

Eine bedeutende Zahl der CF-Patienten zeigt mittlerweile Hinweise auf eine Pilzkolonisation im Sputum und Nachweise positiver Antigene und Antikörper im Serum (14). Diese Pilzbesiedelung sei jedoch meist oberflächlich und chronisch, selten komme es dabei zu einer invasiven oder disseminierten Mykose.

Systemische Pilzkrankungen werden bei CF nur selten beschrieben (4). Gewöhnlicherweise handelt es sich bei dem Vorkommen von Pilzen bei CF-Patienten um eine Kolonisation des Respirationstraktes oder eine lokale Infektion, aber die Prävalenz einer disseminierten Infektion hat zugenommen (4). So wurden z. B. Candidämien vor allem in Verbindung mit Venenkathetern beobachtet (6;12).

Candida albicans gilt allgemein als der am häufigsten diagnostizierte und pathogenetisch bedeutsamste Vertreter der *Candida*-Spezies (37). Die im Rahmen dieser Untersuchung entnommenen Isolate konnten zu 79% dieser Spezies zugeordnet

werden. Dies entspricht auch den Ergebnissen einer früheren Untersuchung: In einer Studie von Doern et al. an CF-Patienten wurden von den untersuchten Hefen 85% als *C. albicans* und 15% als non-*albicans Candida* spp. identifiziert (10). *Candida albicans* wird mittlerweile als zweithäufigster Mikroorganismus im Sputum von CF-Patienten gefunden (3;34). Es konnte in der vorliegenden Studie bei 95% der Patienten *C. albicans* nachgewiesen werden. Oft handelte es sich hierbei um eine chronische Besiedelung. Dies deckt sich mit früheren Untersuchungen: Auch Kerkmann et al. beobachteten eine größtenteils chronische Besiedelung der Atemwege von CF-Patienten mit *C. albicans* (19).

Auch wenn im Allgemeinen der Anteil der non-*albicans Candida* Spezies am Gesamtanteil der Hefen eher gering ist, so ist der Anteil der non-*albicans Candida* spp. zunehmend (25;37). Die Ursache der Zunahme von Vertretern der non-*albicans Candida* Gruppe wird zurzeit vermehrt diskutiert. Reiss et al. stellten die Vermutung auf, dass diese Zunahme u.a. auch begründet werden kann durch eine, im Verlauf der Zeit immer bessere, Identifizierung der einzelnen *Candida*-Spezies (37). Durch die Antimykotika-Therapie, z.B. mit Azol-Antimykotika, kommt es darüber hinaus zu einem Erreger-Shift zu den non-*albicans Candida* Spezies, die zum Teil auf Antimykotika resistenter sind. So trägt die schlechtere Empfindlichkeit einiger non-*albicans* Spezies auf die gängigen Antimykotika sicherlich zu einer Selektion und dadurch zur Zunahme des non-*albicans* Anteils am Gesamtbestand der Hefen bei (37). In einer früheren Studie von Doern et al. lag der Anteil der non-*albicans Candida* Spezies am Gesamtanteil der Hefen bei CF-Patienten bei 15% (10). Bei Doern et al. wurden *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. parapsilosis* als häufigste non-*albicans* Vertreter mit 6%, bzw. 5% und 4% am Gesamtanteil der Hefen nachgewiesen (10).

Über die genaue Verteilung und Häufigkeit der anderen non-*albicans* Spezies bei CF-Patienten liegen bisher noch keine umfassenden Untersuchungen vor.

Während in der vorliegenden Studie *C. tropicalis* mit ca. 1% am Gesamtanteil nur selten vorkam, deckten sich die Beobachtungen von Doern et al. über die Häufigkeit von *C. glabrata* und *C. parapsilosis* mit den Ergebnissen dieser Studie (10). In der vorliegenden Studie konnten 7,3% der Isolate als *C. glabrata* und 4,7% als *C. parapsilosis* identifiziert werden. Ebenfalls häufig war in dieser Untersuchung der Nachweis der erst kürzlich entdeckten *Candida*-Spezies *C. dubliniensis* mit ca. 5,2% am

Gesamtanteil. Zusammen machten diese drei häufigsten non-*albicans* Spezies etwa 17,2% aus und betrug damit etwa 82% der non-*albicans* Gruppe. Die anderen *Candida*-Spezies kamen dagegen nur vereinzelt vor.

Als zweithäufigste *Candida*-Spezies wurde in der vorliegenden Studie *C. glabrata* ermittelt. Sie wurde bei 6,2% der Patienten isoliert. Diese Spezies ist besonders durch seine z.T. intrinsische Resistenz gegenüber Azolen bekannt (25;37;45). Auch *C. parapsilosis*, eine Spezies, die häufig nosokomial erworben wird und mit Kathetern assoziiert ist (37), wurde mit 4,7% am Gesamtbestand und dem Vorkommen bei 11% der Patienten relativ oft isoliert.

Ebenfalls relativ häufig wurde bei der vorliegenden Studie *C. dubliniensis* nachgewiesen. Dieser Erreger wurde erstmals 1995 bei HIV-Patienten als eigene neue *Candida*-Spezies von Sullivan et al. beschrieben (46). Aufgrund seiner morphologischen Ähnlichkeit zu *Candida albicans* wird diese Spezies im Routinelabor oftmals nicht weiter differenziert. Das Krankheitsbild der oropharyngealen Candidose bei HIV-Patienten wird häufig durch *C. dubliniensis* verursacht (18). Lange Zeit wurde *C. dubliniensis* speziell mit AIDS in Verbindung gebracht. So wurde z. B. eine Assoziation von *C. dubliniensis* mit AIDS-Progression hergestellt (18). Während *C. dubliniensis* mit einer Häufigkeit von 15-25% bei HIV-Patienten sehr häufig ist (32), kommt diese Spezies bei nicht HIV-infizierten Patienten dagegen eher selten vor. Nur 0,8 % der nicht-HIV-Patienten wiesen in einer Studie diese Spezies auf (32). Peltroche-Llacsahuanga et al. untersuchten kürzlich das Vorkommen von *C. dubliniensis* bei Mukoviszidose-Patienten und zeigten, daß in dieser Patientengruppe *C. dubliniensis* mit einer Prävalenz von 11,1% im Vergleich zu anderen nicht-HIV-Patienten überdurchschnittlich häufig vorkommt (32).

Bezüglich der Prävalenz von *C. dubliniensis* bei Mukoviszidose-Patienten deckten sich die Beobachtungen der Studie von Peltroche-Llacsahuanga (32) mit denen der hier vorliegenden Studie. Hier wurden bei 56 Patienten 7 Patienten entdeckt (12,5 %), die mindestens einmal *C. dubliniensis* im Sputum aufwiesen. Bei vier dieser Patienten konnte der Erreger sogar über einen längeren Zeitraum von durchschnittlich 12 Monaten nachgewiesen werden. Der Anteil der *C. dubliniensis*-Isolate am Gesamtteil betrug 5,2%.

Peltroche-Llacsahuanga vermutete, dass das signifikant erhöhte Vorkommen von *C. dubliniensis* bei CF-Patienten im Vergleich zu anderen nicht-HIV-Patienten auf die Fähigkeit von *C. dubliniensis* zurückzuführen ist, bei 37°C eine Zelloberflächenhydrophobizität (CSH) zu entwickeln (32). Diese Hydrophobizität spiele eine Rolle in der Virulenz durch die somit erschwerte Phagozytose. Auch spiele das, bei Mukoviszidose vorkommende, zähe und dehydrierte Sekret des Respirationstraktes eine Rolle (32).

Während in der Studie von Peltroche-Llacsahuanga 5 der 6 Patienten mit *C. dubliniensis* über 18 Jahre waren, und die mit *C. dubliniensis* besiedelten Patienten ein durchschnittliches Alter von ca. 20 Jahren hatten, waren dagegen in der vorliegenden Studie vorwiegend jüngere Patienten mit *C. dubliniensis* kolonisiert. Das Durchschnittsalter lag hier bei 12,4 Jahren. Warum bei dieser Studie die Kolonisation von *C. dubliniensis* eher bei jüngeren Patienten nachgewiesen werden konnte und nicht, wie in der Studie von Peltroche-Llacsahuanga (32), bei älteren Patienten, ist unklar.

Die Pathogenität von *C. dubliniensis* bei der Mukoviszidose ist bislang noch nicht geklärt, doch wurde berichtet, dass *C. dubliniensis* in der Lage ist, Candidämien zu verursachen (18). *C. dubliniensis* soll im Vergleich zu *C. albicans* eine höhere Adhärenz an das Bronchialepithel haben (18). Desweiteren wurde bei HIV-Patienten eine im Vergleich zu *C. albicans* höhere Produktion von Sekretyl-Aspartat-Proteinase bei *C. dubliniensis* beobachtet (22). Diese Sekretyl-Aspartat-Proteinase (SAP) steht in Zusammenhang mit der Virulenz von *Candida*-Spezies (17). So wurde in mehreren Studien eine Korrelation zwischen erhöhter SAP-Expression und der vermehrten Virulenz des Erregers aufgezeigt (9;17). Die genaue Bedeutung der einzelnen SAP-Isoenzyme ist jedoch noch unklar und bedarf weiterführender Untersuchungen (17).

Die non-*albicans Candida* Spezies *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa* und *C. rugosa* wurden in der vorliegenden Studie nur selten nachgewiesen. *C. tropicalis* und *C. krusei* werden häufig bei abwehrgeschwächten Patienten isoliert. Aufgrund ihrer schlechteren Empfindlichkeit auf Azole und aufgrund der möglichen nosokomialen Übertragung werden diese Spezies häufig bei AIDS-Patienten oder anderen immunsupprimierten Patienten isoliert. Über das Vorkommen dieser Spezies bei Mukoviszidose ist jedoch noch nicht viel bekannt. In der vorliegenden Studie

wurden diese beiden Spezies nur vereinzelt nachgewiesen: *C. krusei* konnte nur bei einem Patienten und *C. tropicalis* nur bei einem Geschwisterpaar nachgewiesen werden.

Es zeigte sich, daß zwei Drittel der Patienten meist nur eine Hefeart im Sputum aufwiesen. Meist handelte es sich hierbei um *C. albicans*. Aber auch mehrere verschiedene *Candida*-Spezies konnten im Sputum einzelner Patienten nachgewiesen werden. Die Stämme persistierten meist über einen längeren Zeitraum (je nach Spezies zwischen 8 und 18 Monaten). Die unterschiedliche Persistenz der einzelnen *Candida*-Spezies ist dabei nicht nur abhängig von der Spezies, sondern v.a. von deren Häufigkeit und den unterschiedlichen Untersuchungszeiträumen der einzelnen Patienten, sowie dem Zeitpunkt der erstmaligen Isolierung. Unsere Beobachtungen bezüglich der Persistenz der *Candida*-Stämme bei Mukoviszidose-Patienten bestätigen die Beobachtungen früherer Studien, die zeigten, daß es sich bei CF-Patienten meist um eine chronische Besiedelung von *C. albicans* handelt (19). Jedoch zeigten sich Unterschiede zu einer früheren Studie von Bauernfeind et al., die keine längere Persistenz von *C. albicans* bei CF-Patienten beobachteten (3). Bauernfeind et al. berichten, dass im Laufe einer Studie an 20 Patienten *C. albicans* meistens nur kurze Zeit persistierte. Die Persistenzrate betrug nur 12,5% und war trotz fehlender antimykotischer Behandlung in höchstens 2 aufeinanderfolgenden Sputen nachweisbar, so dass man schlußfolgerte, dass ein spezieller Eradikationsversuch gegen *C. albicans* unnötig sei (3).

Es ist zu berücksichtigen, dass *C. albicans* trotz Besiedelung nicht immer im Sputum nachgewiesen werden kann, so dass diese Zahlen nicht unbedingt einer längeren Persistenz von *C. albicans* widersprechen. In der vorliegenden Studie konnte die Theorie einer nur kurzen Besiedelung von *C. albicans* nicht bestätigt werden. Hier zeigte *C. albicans* eine durchschnittliche Persistenz von 16,7 Monaten. Auch viele *non-albicans* Spezies zeigten einen durchschnittlichen Besiedelungszeitraum von über einem Jahr. Ausnahmen waren *C. krusei* und *C. kefyr* und *C. parapsilosis* mit 8, bzw. 8,5 und 9 Monaten durchschnittlicher Persistenz. Dass *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa* und *C. rugosa* nur einmalig bei Patienten isoliert werden konnten, liegt vor allem daran, dass diese Spezies erst gegen Ende des Untersuchungszeitraumes isoliert wurden. Man

kann also nicht daraus schließen, dass diese Spezies eine geringere, bzw. keine Persistenz zeigen.

In der vorliegenden Studie wurde anhand der molekularen Typisierung gezeigt, dass isogene Stämme meist über mehrere Monate persistierten, es handelt sich also nicht um eine Kolonisation ständig wechselnder Stämme, sondern hauptsächlich um die Persistenz eines Stammes. Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses ist zu erwägen, ob evtl. bei chronischer Kolonisation mit einem isogenen Stamm und fehlendem Nachweis anderer Mikroorganismen der Versuch einer Eradikation unternommen werden sollte.

Die Kenntnis über die *in vitro*-Empfindlichkeit der einzelnen *Candida*-Spezies auf die verschiedenen Antimykotika und über das Risiko einer Resistenzentwicklung sind wichtige Voraussetzungen für eine Antimykotika-Therapie. Allerdings muß dabei bedacht werden, dass die *in vitro*-Testungen speziell für Antimykotika noch so wenig standardisiert sind, dass sie zwar einen Hinweis auf die Antimykotika-Empfindlichkeit *in vivo* geben können, diese jedoch nicht immer der tatsächlichen *in vivo*-Wirksamkeit entsprechen. So ist z. B. in einer Studie von Müller et al. aufgezeigt worden, dass die Wahl des Wachstumsmediums einen entscheidenden Einfluß auf die Empfindlichkeitswerte hatte. So waren z.B. die Werte für Caspofungin und Amphotericin bei Gebrauch des Mediums RPMI niedriger als bei Gebrauch des HR-Mediums (28). Die in den USA verbreitete Methode der MHK-Bestimmung nach NCCLS-M27A (unter Gebrauch des RPMI-Mediums) ist in Deutschland nicht etabliert. Hier wird vor allem eine Modifikation mit HR-Medium angewandt. In einer vergleichenden Studie fanden Ruhnke et al. heraus, dass beide Medien eine gute Korrelation der Ergebnisse zeigten bei der Untersuchung von Amphotericin B, Fluconazol und Flucytosin. Dagegen war die Korrelation bei Itraconazol nicht so gut (40). Jedoch zeigten beide Testverfahren eine gute Korrelation zwischen *in vitro* und *in vivo*, wobei jedoch die Tests nicht zwingend eine Vorhersage über die klinische Antwort des Organismus nach Fluconazolgabe machen konnten (40).

Doch auch bei einem Medium mit guter Korrelation von *in vivo*- und *in vitro*-Ergebnissen muß immer noch von Faktoren ausgegangen werden, die die Empfindlichkeit *in vivo* beeinflussen können. So kann man auch von den Ergebnissen

dieser Studie nur mit Vorsicht auf die wahrscheinliche Wirkung der Antimykotika im Patienten schließen.

Die *in vitro*-Werte bei den einzelnen Spezies zeigten ganz überwiegend eine gute Empfindlichkeit der untersuchten Antimykotika Amphotericin B, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, 5-Flucytosin und Micafungin auf. Alle getesteten *C. lusitaniae*-, *C. kefyr*-, *C. rugosa*- und *C. dubliniensis*-Isolate waren gut empfindlich auf alle Antimykotika. Bei *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pelliculosa* und *C. glabrata* fanden sich bei einigen Isolaten erhöhte MHK-Werte, diese werden nun jeweils einzeln diskutiert.

Von *C. albicans*, dem wichtigsten und häufigsten Erreger einer Candidose ist bekannt, dass er zwar meist empfindlich auf die gängigen Antimykotika ist, jedoch nach längerer Antimykotikagabe *in vitro*-Resistenzen, z. B. gegenüber Fluconazol und anderen Azolen entwickeln kann (13).

Unsere Ergebnisse zeigten für *C. albicans* ganz überwiegend gut empfindliche MHK-Werte für die Antimykotika Amphotericin B, 5-Flucytosin, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol und Micafungin.

Lediglich bei Isolaten von zwei Patienten konnten erhöhte Werte bei der *in vitro*-Resistenzbestimmung festgestellt werden: Bei einem Patienten fanden sich erhöhte Werte von *C. albicans* gegenüber 5-Flucytosin, obwohl dieser Patient vorher noch nicht mit Antimykotika behandelt worden war. Die einzelnen *C. albicans*-Isolate waren nach molekularer Beurteilung höchstwahrscheinlich miteinander verwandt. Hier scheint, da der Patient vorher nicht mit Antimykotika behandelt worden war, eine natürliche Resistenz von *C. albicans* gegen 5-Flucytosin vorzuliegen. In der Literatur wurde schon von einer natürlichen Resistenz von *C. albicans* gegenüber 5-Flucytosin berichtet: Kerkmann et al. fanden bei einem CF-Patienten einen rot pigmentierten *C. albicans*-Stamm, der eine Resistenz gegen 5-Flucytosin ohne vorherigen Antimykotika-Kontakt aufwies (19). Obwohl in der vorliegenden Studie der Patient keine rote Pigmentierung der *C. albicans*-Kolonien aufwies, liegt wahrscheinlich auch hier eine natürliche Resistenz gegenüber 5-Flucytosin vor.

Der zweite Patient hatte Resistenzen bzw. erhöhte MHK-Werte gegenüber allen drei

untersuchten Azolen. Die molekulare Typisierung zeigte, dass alle *C. albicans*-Isolate dieses Patienten höchstwahrscheinlich miteinander verwandt waren. Auch dieser Patient wurde vorher nicht mit Antimykotika behandelt. Ob dieser *C. albicans*-Stamm schon primär resistent gegenüber Azolen war, oder ob er diese Resistenz sekundär erworben hatte ist nicht geklärt. Es könnte sich bei diesem Patienten um das Vorliegen eines gegen Azole resistenten *C. albicans*-Stammes handeln, wahrscheinlicher erscheint aber, dass eine Transmission eines resistenten Keimes von einem anderen Patienten erfolgte. Eine intrinsische Resistenz von *C. albicans*-Stämmen gegenüber Azolen ist nicht gesichert. Zwar wurde in der Literatur das Vorkommen von primär resistenten *C. albicans*-Erregern gegenüber Fluconazol bei HIV-infizierten Patienten beschrieben (23), jedoch konnte auch hier eine Transmission von anderen Patienten nicht ausgeschlossen werden. Dies ist sogar als wahrscheinlicher anzusehen. Von dem Vorliegen von intrinsisch gegen Azole resistenten *C. albicans*-Stämmen bei CF-Patienten ist noch nichts bekannt, jedoch wurde dies noch nicht näher untersucht. Da auch schon Übertragungen von resistenten *C. albicans*-Keimen von einem antimykotisch behandelten AIDS-Patienten auf den unbehandelten Partner beobachtet wurden (11), könnte es durchaus möglich sein, dass dieser resistente Keim anderweitig, z. B. bei einem antimykotisch behandelten Patienten seine Resistenz erworben hatte und dann auf den nicht vorbehandelten Patienten übertragen wurde (11;27).

Eine Fähigkeit zur Resistenzentwicklung von *C. albicans* bei Antimykotikakontakt ist bekannt (35;41). Auch die verschiedenen Ursachen der Resistenzentwicklung von *C. albicans*, wie z. B. Mutationen im *ERG11*-Gen (das für Drug Target Enzyme Sterol 14a Demethylase kodiert), oder Überexpressionen der Multidrug-Transport-Proteine MDR und CDR wurden schon näher charakterisiert (13). Eine natürliche Resistenz von *C. albicans* gegen bestimmte Antimykotika wurde zwar schon vereinzelt beschrieben (19;23), ist jedoch nicht sehr häufig zu finden. Daher ist es interessant, dass in der vorliegenden Studie von 56 CF-Patienten zwei Patienten eine Resistenz von *C. albicans* gegen Flucytosin, bzw. gegen Azole aufwiesen.

Ebenso wie bei *C. albicans* kann es bei *C. dubliniensis* nach längerer Fluconazol-Behandlung zur Entwicklung einer Fluconazol-Resistenz kommen (35;41). Bei der vorliegenden Studie konnte jedoch keine Reduktion der *in vitro*-Empfindlichkeit von *C.*

dublinskiensis gegenüber den untersuchten Antimykotika festgestellt werden. Alle *C. dublinskiensis*-Isolate waren gut empfindlich auf die untersuchten Antimykotika. Die Isolate waren generell empfindlicher auf Amphotericin B, Flucytosin, Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol. Bei Micafungin waren die MHK-Werte etwas höher als bei *C. albicans*, jedoch waren die Werte nur geringfügig (d. h. um eine Stufe) höher. Diese Beobachtungen wurden auch schon früher gemacht (28) und decken sich mit den Ergebnissen dieser Untersuchung.

Bei *C. glabrata* ist eine intrinsische Resistenz gegenüber Azolen bekannt und schon öfters beschrieben worden (25;45). Desweiteren ist *C. glabrata* in der Lage, nach Antimykotika-Kontakt Resistenzen zu entwickeln.

Auch bei der vorliegenden Studie konnten Resistenzen, bzw. eine beginnende Resistenzentwicklung von *C. glabrata* in der Mehrheit der Fälle aufgezeigt werden: Bei 20 der 24 untersuchten *C. glabrata*-Isolate zeigten sich erhöhte Werte gegen Fluconazol. Bei 8 der 20 weniger empfindlichen Isolate war zusätzlich auch eine beginnende Kreuzresistenz mit Itraconazol erkennbar. Kreuzresistenzen zwischen verschiedenen Azolen sind in der Literatur bekannt, so dass es nicht erstaunlich ist, dass auch hier Kreuzresistenzen zwischen mehreren Azolen vorkamen (23;35). Gegenüber dem neuen Azol Voriconazol jedoch waren alle *C. glabrata*-Isolate sensibel.

Die MHK-Werte für Fluconazol und Itraconazol bei *C. glabrata* befanden sich zwar meist noch im empfindlichen Bereich, jedoch an der obersten Grenze. Der Mittelwert für Fluconazol betrug 11,1 µg/ml, der für Itraconazol 0,4 µg/ml. In manchen Fällen lagen die MHK-Werte auch schon im dosisabhängig-empfindlichen Bereich. Man kann davon ausgehen, dass diese Isolate mit der Zeit eine Resistenz entwickeln können. Von den Patienten, die *C. glabrata* im Sputum aufwiesen, wurden drei mit Itraconazol behandelt. Lediglich bei einem der drei antimykotisch behandelten Patienten zeigte sich *C. glabrata* gegenüber Itraconazol und Fluconazol grenzwertig empfindlich. Bei diesem Patienten könnte es sein, daß die Gabe von Itraconazol zu der Entwicklung einer beginnenden Resistenz geführt hat. Bei den übrigen untersuchten Patienten wird eher eine primär verringerte Empfindlichkeit von *C. glabrata* gegenüber Itraconazol und Fluconazol vermutet.

Noch häufiger als bei *C. glabrata* ist auch bei *C. krusei* eine natürliche Resistenz gegenüber Azolen beschrieben worden (2;23;25;45). Während *C. glabrata* z.T. noch empfindlich auf Azole reagiert, ist *C. krusei* praktisch immer resistent gegenüber Azolen. Auch in dieser Untersuchung zeigten sich beide *C. krusei*-Isolate gegen die drei Azole vermindert sensibel und gegen Flucytosin resistent. (Mittelwert Fluconazol 40µg/ml, Itraconazol 0,4µg/ml, Voriconazol 0,5 µg/ml, Flucytosin 36µg/ml). Beide Isolate stammten von demselben Patienten, der zwar keine Antimykotika erhalten hatte, dessen Bruder aber mit Itraconazol behandelt wird. Es könnte zwar sein, dass der Bruder unter Antimykotikatherapie ein resistentes Isolat entwickelt hat und dieses dann auf seinen Bruder übertragen hat, jedoch wurde bei dem behandelten Bruder innerhalb des Untersuchungszeitraumes kein *C. krusei*-Stamm isoliert, so dass kein molekularer Vergleich der Isolate durchgeführt werden konnte. Es spricht eher dafür, dass hier eine natürliche Resistenz von *C. krusei* gegenüber den Azolen und gegenüber 5-Flucytosin vorlag.

Resistenzen von *C. krusei* gegen Flucytosin wurden ebenfalls schon beschrieben (2). Gegen Amphotericin B und Micafungin zeigten sich beide *C. krusei*-Isolate gut empfindlich.

Von *C. lusitaniae* ist bekannt, daß es leicht *in vitro*-Resistenzen gegenüber Amphotericin B entwickeln kann (45), jedoch konnte in der vorliegenden Studie keine Resistenz von *C. lusitaniae* beobachtet werden. Es wurden für Amphotericin B zwar noch keine Breakpoints durch die NCCLS festgelegt, doch im Vergleich zu den anderen *Candida*-Spezies wies *C. lusitaniae* nur leicht erhöhte Werte (um eine Stufe höher) gegenüber Amphotericin B auf.

Erhöhte MHK-Werte hatte desweiteren *C. tropicalis* für die Azole. Obwohl *C. tropicalis* noch nicht zu den Erregern zählt, die eine schlechte Empfindlichkeit auf Antimykotika aufweisen, wurde schon mehrmals von Resistenzentwicklungen und sogar von intrinsischen Resistenzen bei *C. tropicalis* berichtet (38;43). Alle sechs in der vorliegenden Studie untersuchten *C. tropicalis*-Stämme zeigten eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber den drei Azolen. Es könnte sich hier ebenfalls um eine erworbene Resistenz gegenüber den Azolen handeln, da alle *C. tropicalis*-Keime

erhöhte MHK-Werte zeigten. Man muß allerdings beachten, dass die sechs in dieser Studie untersuchten *C. tropicalis*-Keime von zwei Geschwister-Patienten stammen, von denen nur der eine mit Itraconazol behandelt wird. In der RAPD-PCR waren die sechs *C. tropicalis*-Isolate höchstwahrscheinlich miteinander verwandt. Obwohl man berücksichtigen muß, dass die RAPD-PCR eine schlechtere Diskriminierungsfähigkeit besitzt als z. B. die Southern-Hybridisierung, läßt dies trotzdem die Spekulation zu, dass sich hier eine Resistenz gegen *C. tropicalis* unter Itraconazol-Therapie entwickelt hat, und dieser resistente Stamm auch auf den Bruder übertragen wurde. Die Möglichkeit einer nosokomialen Übertragung von *C. tropicalis* bei HIV-Patienten wurde schon in früheren Studien diskutiert, da sich bei epidemiologisch verwandten Isolaten oftmals das gleiche DNA-Muster in der molekularen Typisierung gezeigt hatte (48). Gegen die Übertragung eines durch Antimykotika-Kontakt resistent gewordenen Stammes spricht hier jedoch, dass die ersten *C. tropicalis*-Isolate schon vor der Antimykotikagabe isoliert wurden und ebenfalls erhöhte Werte gegen Azole aufwiesen. Es könnte sich hier also auch um eine natürliche Azol-Resistenz der *C. tropicalis*-Keime handeln. Eine Resistenz von *C. tropicalis* gegenüber Azolen wurde in der Literatur schon häufiger beschrieben (2;23). Auch Resistenzen von *C. tropicalis* gegen Azole ohne vorherige Azol-Exposition sind bekannt (43). Magaldi et al. diskutierten, *C. tropicalis* neben *C. glabrata* und *C. krusei* in die Gruppe der weniger empfindlichen *Candida*-Spezies aufzunehmen (23).

Bei *C. tropicalis* ist nicht nur eine natürliche Resistenz gegenüber Azolen bekannt, sondern es ist auch über die Fähigkeit von *C. tropicalis* zur Resistenzentwicklung nach Azol-Exposition berichtet worden. Unter den Patienten der vorliegenden Studie war auch ein Patient, der mit *C. tropicalis* besiedelt war und mit Antimykotika behandelt wurde. Bei der Überprüfung einer möglichen Resistenz-Entwicklung unter Antimykotika-Gabe zeigte sich, dass sich der *C. tropicalis*-Stamm bei der *in vitro*-Resistenztestung wenig empfindlich gegenüber Itraconazol gezeigt hatte. Gegen eine schwächere Persistenz von *C. tropicalis* spricht, dass der Bruder dieses Patienten, der ebenfalls mit *C. tropicalis* besiedelt ist, jedoch nicht mit Antimykotika behandelt wurde, diesen Stamm über einen Zeitraum von über 18 Monaten aufwies, so dass eine schlechte Persistenz von *C. tropicalis* nicht wahrscheinlich erscheint.

Bei *C. parapsilosis* zeigte sich eine herabgesetzte Empfindlichkeit auf das neue Echinocandin Micafungin. Da alle *C. parapsilosis*-Stämme wenig empfindlich auf Micafungin waren und keiner der Patienten zuvor mit einem Echinocandin behandelt wurde, kann man davon ausgehen, dass hier intrinsisch erhöhte MHK-Werte von *C. parapsilosis* gegen Micafungin vorliegen. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass dies ein *in vitro*-Phänomen sein muß, denn in klinischen Studien konnten alle *C. parapsilosis*-Stämme gut mit Micafungin oder Caspofungin behandelt werden.

Die vorliegende Studie hat frühere Beobachtungen bestätigt, dass vor allem die Vertreter der non-*albicans* Gruppe eine meist von Natur aus verringerte Empfindlichkeit gegenüber einigen Antimykotika, besonders gegenüber den Azolen zeigen. Diese verminderte Empfindlichkeit kann unter anderem dazu beitragen, daß der Anteil der non-*albicans* Erreger zunimmt (37).

Auffällig war, daß vor allem gegenüber Azolen Resistenzen zu finden waren. Dies liegt wahrscheinlich in der häufigen Anwendung der Azole.

Ein weiterer Teil dieser Studie beschäftigte sich mit der Frage, ob die Gabe von Antimykotika Auswirkungen auf die Resistenzlage der Erreger und auf Änderungen in der pilzlichen Flora dieser Patienten hatte. Um die Auswirkungen einer Antimykotikagabe auf die einzelnen Erreger besser abschätzen zu können, wurden zwölf Patienten, die mit Antimykotika behandelt wurden oder noch werden, auf Pilzbesiedelung vor und während, bzw. nach Antimykotikagabe untersucht. Auffällig dabei zeigte sich, daß die vor Antimykotika-Gabe isolierten Stämme in den meisten Fällen nach Antimykotikagabe nicht mehr isoliert wurden. Der Behandlungserfolg war dabei auch von der behandelten Spezies abhängig: *C. albicans*, ein Erreger der im allgemeinen als gut empfindlich auf Antimykotika gilt (3;34), konnte in fünf Fällen nach Antimykotikagabe nicht mehr nachgewiesen werden. In sieben Fällen wurde nach Antimykotikagabe *C. albicans* im Sputum nachgewiesen. Dies ist insofern erstaunlich, da sich bei der *in vitro*-Resistenztestung alle diese *C. albicans*-Erreger empfindlich auf die Antimykotika zeigten und keine Resistenzen nachgewiesen werden konnten. Es handelt sich dabei wohl um unterschiedliche Stämme. Bei einem Patienten, der sowohl vor als auch nach Antimykotika-Gabe *C. albicans*-Isolate aufwies untersuchten wir die

Stämme auf eine genetische Verwandtschaft. In der molekularen Typisierung zeigten sich unterschiedliche Stämme.

Im Gegensatz zu *C. albicans*, der bei 7 Patienten nach Antimykotikagabe noch im Sputum zu finden war und nur bei 5 Patienten nicht mehr nachweisbar war, ließen sich *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* und *C. tropicalis* nach Antimykotikagabe nicht mehr nachweisen. Beide Patienten die *C. parapsilosis* im Sputum hatten, wiesen diese Spezies unter der Antimykotikatherapie nicht mehr auf. Ebenso war der *C. tropicalis*- und der *C. dubliniensis*-Stamm eines Patienten nach Antimykotikagabe nicht mehr nachweisbar.

Leider konnte aufgrund der geringen Anzahl der Stämme keine allgemeingültige Aussage über den Antimykotika-Erfolg bei diesen Spezies gemacht werden. *C. parapsilosis* gilt allgemein als gut empfindlich auf Antimykotikagabe (38;43). *C. dubliniensis* ist zwar in der Lage, Resistenzen gegen Fluconazol unter längerer Fluconazoltherapie zu entwickeln (35;41;18), allerdings ist diese Spezies von Natur aus eher empfindlich gegen Antimykotika (28). So war auch hier die Antimykotika-Gabe wirksam.

Bei der Untersuchung der antimykotisch behandelten Patienten fiel auf, dass unter Antimykotikagabe eine Änderung der pilzlichen Flora stattgefunden hatte. So wurde bei drei Patienten nach Antimykotikagabe *C. glabrata* isoliert, ein Erreger, der vor Antimykotika-Therapie noch nicht isoliert wurde.

Auch in Studien der Hefe-Kolonisation bei HIV-Patienten wurde beobachtet, dass *C. glabrata* vor allem bei Patienten mit vorausgehender Azol-Exposition isoliert wurde (47). Wong-Beringera et al. erklärten diese Beobachtung dadurch, dass eine vorausgehende Azol-Exposition wahrscheinlich zu einer verminderten Azol-Empfänglichkeit von *C. glabrata* führe und dadurch eine Selektion begünstige. Jedoch könne eine Azolexposition nicht alleinige Ursache einer Selektion zugunsten von non-*albicans* Spezies sein (47).

In der vorliegenden Studie war *C. glabrata* zwar bei drei Patienten unter Antimykotika-Therapie zu finden, die Isolate waren aber noch auf Itraconazol empfindlich. Jedoch wurden bei einem Patienten schon grenzwertig erhöhte MHK-Werte gegenüber Fluconazol und Itraconazol gefunden.

Auch scheint eine Antimykotika-Gabe die Besiedelung von *C. kefyr* zu begünstigen. Von zwei Patienten, die *C. kefyr* im Sputum aufwiesen, wurde einer bereits mit Antimykotika behandelt. Obwohl *C. kefyr* auch in der aktuelleren Literatur als nicht humanpathogen angesehen wird, konnten in dieser Studie bei zwei Patienten *C. kefyr* isoliert werden.

Man könnte sagen, dass sich in der vorliegenden Studie der Trend der Besiedelung von empfindlicheren *Candida*-Spezies zu weniger empfindlichen *Candida*-Spezies unter Antimykotika-Gabe bestätigt hat.

Insgesamt konnte bei den antimykotisch behandelten Patienten zwar in einigen Fällen eine Resistenz nachgewiesen werden, jedoch bestehen in diesen Fällen Hinweise auf eine intrinsische Resistenz. Die Entwicklung einer Resistenz aufgrund von Antimykotikagaben konnte bei keinem Patienten mit Sicherheit nachgewiesen werden. Wahrscheinlich kam es bei der vorliegenden Studie zu keiner Resistenzentwicklung. Es könnte aber auch sein, dass der Zeitraum der Antimykotikagabe für eine Resistenzentwicklung zu kurz war, oder aber der Untersuchungszeitraum dieser Studie war zu kurz, um eine evtl. stattgefundene Resistenzentwicklung aufzuzeigen.

Eine beginnende Resistenzentwicklung lässt sich bei einem der zwölf mit Antimykotika behandelten Patienten aufgrund der höheren Werte für Fluconazol und Itraconazol vermuten.

Besondere Aufmerksamkeit wurde in dieser Studie auf die neueren Antimykotika, nämlich das neue Triazol Voriconazol und das Echinocandin Micafungin gerichtet.

Es wurde in Studien nachgewiesen, dass Voriconazol auch bei fluconazolresistenten Erregern wirksam ist, jedoch konnte ein leichter Abfall der Aktivität bei auf Fluconazol resistenten oder dosisabhängig-empfindlichen Erregern nachgewiesen werden (33).

In anderen Studien zeigte sich jedoch eine Kreuz-Resistenz von Fluconazol und Voriconazol. Im Vergleich mit den herkömmlichen Antimykotika Amphotericin B, Flucytosin, Fluconazol und Itraconazol hat Voriconazol ein breiteres Spektrum und eine höhere *in vitro*-Aktivität (33).

Auch in der hier diskutierten Studie bestätigte sich die Beobachtung, dass Voriconazol durchgehend niedrigere MHK-Werte zeigte als die Azole Fluconazol und Itraconazol,

sowie Amphotericin B und Flucytosin. Auch bei einigen, gegenüber Fluconazol und Itraconazol resistenten, Isolaten zeigte sich Voriconazol noch empfindlich. Jedoch konnte bei einigen Spezies z. B. bei *C. tropicalis* und *C. krusei* eine Kreuzresistenz aller drei Azole beobachtet werden. Voriconazol gilt aufgrund seiner im Vergleich zu anderen Azolen stärkeren Potenz als Alternative zu Fluconazol (31;33). Micafungin hat eine sehr gute *in vitro*- und *in vivo*- Wirksamkeit, insbesondere gegenüber den non-*albicans Candida spp.* und gegen multiresistente Erreger (7;15).

Um eine Aussage über die Persistenz isogenetischer Stämme treffen zu können, wurden die einzelnen Isolate eines Patienten mittels molekularer Typisierungsverfahren auf genetische Verwandtschaftsbeziehungen untersucht.

Als Methoden wurden die RAPD-PCR und bei *C. albicans*-Isolaten zusätzlich noch die in-Situ-Hybridisierung (ISH) verwendet. Die PCR gilt zwar als schnelles Hilfsmittel zur Identifizierung der einzelnen *Candida*-Arten, doch obwohl die RAPD-PCR fähig ist, zwischen einzelnen Spezies zu differenzieren, kann sie oft nicht gut Unterschiede innerhalb einer Spezies aufzeigen (45). Es wurden auch Probleme in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aufgezeigt (37). Obwohl die PCR die meist preiswertere und schnellere Möglichkeit der molekularen Typisierung ist (29;37), hat die ISH eine größere Diskriminierungsfähigkeit und eine bessere Reproduzierbarkeit (37). Für eine retrospektive Untersuchung eines Kollektivs ist daher eine besser reproduzierbare und besser diskriminierende Methode, wie z. B. die ISH oder die PFGE (Pulsfeld-Gel-Elektrophorese) zu bevorzugen (37). Außerdem sollten immer mehrere Verfahren kombiniert werden, um eine möglichst große Sicherheit bei der Typisierung zu erreichen.

Die Hybridisierung zeigt in bezug auf Reproduktion und Kosten die besten Parameter unter den verschiedenen molekularen Typisierungsverfahren (29).

Auch in der vorliegenden Studie bestätigte sich die Beobachtung früherer Studien, dass die Hybridisierung mit einer für *C. albicans* spezifischen Sonde besser zwischen verwandten Genotypen unterscheiden konnte als die RAPD-PCR. Die RAPD-PCR zeigte meist das gleiche Banden-Muster bei in der Hybridisierung sehr ähnlichen, aber doch in ein oder zwei Banden verschiedenen Isolaten. Diese Isolate galten als höchstwahrscheinlich miteinander verwandt. Bei Isolaten, die sich im Bandenmuster bei der Hybridisierung stärker voneinander unterschieden und als möglicherweise verwandt

oder nicht verwandt eingestuft wurden, konnten auch in der PCR meist Unterschiede im Bandenmuster entdeckt werden.

In einigen Fällen allerdings waren bei der Hybridisierung nur einige wenige schwache Banden zu erkennen, so dass dieser Blot nur unter Einschränkungen beurteilt werden konnte. Bei diesen Hybridisierungen zeigte die RAPD-PCR eine größere Diskriminierungsfähigkeit. Aus dem Vergleich der beiden Methoden kann man erkennen, dass die Hybridisierung eine geeignete Methode ist, um zwischen eng verwandten Isolaten einer Spezies zu unterscheiden. Sie ist aussagekräftiger als eine RAPD-PCR, dabei allerdings zeit- und kostenaufwendiger als diese.

Die RAPD-PCR kann als eine schnelle und sichere Methode eingesetzt werden, um zwischen einzelnen *Candida*-Spezies zu unterscheiden. Sie ist jedoch nicht in der Lage verschiedene Stämme einer Spezies genauer zu differenzieren. Die interspezifische Differenzierung durch die PCR war jedoch bei allen untersuchten *Candida*-Spezies gut.

In der vorliegenden Studie wurden die Isolate aus der *Candida albicans*-Gruppe durch eine Hybridisierung mittels CARE2-Sonde und durch eine RAPD-PCR mittels RPO2-Primer auf molekularer Basis typisiert. Die CARE2-Hybridisierung gilt als verlässliche und sensitive Methode zur genotypischen Analyse von Verwandtschaftsbeziehungen bei *C. albicans* (22) und dadurch zur Aufdeckung von Übertragungswegen (25).

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse der molekularen Typisierung fällt auf, dass die meisten Patienten im Laufe des Untersuchungszeitraumes mehrere Genotypen in der Hybridisierung zeigten. Nur Patienten, die in einem kürzeren Zeitraum untersucht wurden, oder bei denen die Qualität der Hybridisierung schlechter war, so dass sie nur einige wenige schwache Banden zeigten, hatten dasselbe Bandenmuster.

Auffällig ist bei Betrachtung der Ergebnisse allerdings, dass die Patienten zwar meist mehrere Genotypen im Verlauf der Erkrankung aufwiesen, dass diese Genotypen sich aber im Bandenmuster meist nur in ein oder zwei Banden unterschieden, so dass diese Isolate höchstwahrscheinlich miteinander verwandt sind oder durch kleinere Mutationen in der Genstruktur auseinander hervorgegangen sein könnten. Dieses als Mikroevolution oder „substrain-shuffling“ bezeichnete Phänomen ist in der gängigen Literatur schon öfter beschrieben worden (13;37;41). Reiss et al. stellten diese

Mikroevolutionen vor das Problem, wie groß der Unterschied im Bandenmuster sein muß, um zwei Isolate sicher als verschiedene Arten definieren zu können (37). Bei dieser Studie wurde daher der Begriff „identisch“ bewusst vermieden. Hier wurden die Isolate in höchstwahrscheinlich verwandte, wahrscheinlich verwandte und nicht verwandte Isolate eingeteilt.

Die geringfügigen Änderungen in den Bandenmustern der einzelnen Isolate setzten sich meist über den gesamten Untersuchungszeitraum fort. Bei den Patienten, die über einen längeren Zeitraum denselben oder einen sehr ähnlichen Stamm aufwiesen, läßt sich folgern, dass es sich um eine Persistenz eines Erregers handeln könnte, der sich durch kleinere Mutationen dem Wirtsmilieu anzupassen versucht. Im Gegensatz zu früheren Studien von Bauernfeind et al. (3), sowie von Franz et al. (34) wurde hier festgestellt, dass die meisten Stämme oftmals über einen längeren Zeitraum persistierten. Meist kam nicht nur eine Persistenz derselben Spezies vor, sondern oft persistierte sogar der gleiche oder ein sehr eng verwandter isogenetischer Stamm über einen längeren Zeitraum. Nur bei 10 von 45 Patienten konnte ein Wechsel des Stammes, bzw. verschiedene nicht miteinander verwandte *C. albicans*-Stämme im Krankheitsverlauf nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass ein spontaner Wechsel eines Stammes oder einer Art nicht so häufig ist wie früher vermutet (3;34).

Zudem war auffällig, dass sehr häufig, nämlich in 44% der Fälle, Hinweise auf Mikroevolutionen beobachtet werden konnten.

Schon in mehreren Fällen wurde bei AIDS-Patienten, die längere Zeit mit Fluconazol behandelt wurden, eine zunehmende Fluconazolresistenz unter dem Bild einer Mikroevolution entdeckt (22;41). Es ist noch nicht genau geklärt, ob es sich hier um eine zufällige und pathogenetisch nicht relevante Änderung der Genstruktur handelt, oder ob diese Mikroevolutionen einen gezielten Mechanismus in der Entstehung einer Resistenz gegen Antimykotika darstellen. Es kann auch zu einem Chromosomen-Rearrangement kommen (49). Man weiß mittlerweile, dass mehrere molekulare Mechanismen zu einer Resistenzentwicklung führen können. Die Vermutung legt jedoch nahe, dass gerade Mikroevolutionen dabei eine entscheidende Rolle spielen.

In der vorliegenden Studie kamen solche minimalen Änderungen der Genstruktur bei fast der Hälfte der Patienten vor. Nur wenige dieser Patienten erhielten während des

Beobachtungszeitraums Antimykotika. Es wird vermutet, daß Mikroevolutionen einen Versuch der Hefen darstellen, sich an eine veränderte Umgebung anzupassen, die allerdings nicht nur auf eine Antimykotika-Gabe zurückzuführen ist. Vielmehr wird spekuliert, dass z.B. die Gabe von anderen Medikamenten, wie z.B. Antibiotika, Änderung im Krankheitsverlauf, in der Beschaffenheit des Sputums oder in der mikrobiologischen Besiedelung der Lunge eine Rolle spielen könnten. Der Antibiotika-Gebrauch ist bei Mukoviszidose-Patienten häufig. Die Patienten der vorliegenden Studie sind alle aufgrund wechselnder bakterieller Infektionen mit verschiedenen Antibiotika behandelt worden.

Die möglichen Auslöser für Mikroevolutionen sollten in Zukunft jedoch noch genauer untersucht werden.

Die Untersuchung der Spezies aus der *non-albicans* Gruppe wurde dadurch erschwert, dass die Hybridisierung mit der CARE2-Sonde auf diese Spezies-Gruppe nicht angewendet werden konnte, und so die Differenzierung nur mit der RAPD-PCR erfolgte. Der Primer RPO2 zeigt unterschiedliche Diskriminierungsfähigkeit bei den verschiedenen *Candida*-Spezies. So war er gut geeignet, um zwischen einzelnen *C. albicans*-Isolaten zu unterscheiden, solange diese nicht zu eng verwandt waren. Bei *C. glabrata*, *C. dubliniensis* und *C. parapsilosis* war die intraspezifische Differenzierung weniger genau. Bei *C. krusei*, *C. tropicalis* und *C. kefyr* konnte dieser Primer nur noch schlecht innerhalb einer Spezies differenzieren. So zeigten alle *C. kefyr*-Isolate dasselbe Muster, ebenso wie alle *C. tropicalis*-Isolate und alle *C. krusei*-Isolate. Alle *C. kefyr*-Isolate, *C. tropicalis*-Isolate und *C. krusei*-Isolate galten aufgrund ihres Bandenmusters als höchstwahrscheinlich verwandt, wobei die schlechtere Diskriminierungsfähigkeit der RAPD-PCR zu berücksichtigen ist, so dass keine sichere Aussage über den tatsächlichen Verwandtschaftsgrad dieser Isolate gemacht werden kann. Eine Differenzierung zum Kontrollstamm war jedoch bei *C. tropicalis* und *C. krusei* vorhanden. Bei den Spezies *C. dubliniensis*, *C. glabrata* und *C. parapsilosis* war die Differenzierung durch den Primer RPO2 etwas besser, jedoch nicht so gut wie bei *C. albicans*. Viele *C. dubliniensis*-Isolate wurden als höchstwahrscheinlich verwandt eingestuft, einige betrachtete man als möglicherweise verwandt. Dieselben Ergebnisse zeigten auch die molekularen Typisierungen der *C. glabrata* und *C. parapsilosis*-

Isolate. Auch hier muß die schlechtere Diskrimination der PCR berücksichtigt werden. Zusätzlich zu der RAPD-PCR wurden die einzelnen *C. dubliniensis*-Isolate mit der CARE2-Sonde hybridisiert. 7 Isolate, die ursprünglich als *C. albicans* diagnostiziert worden waren, konnten durch die ISH aufgrund eines fehlenden Signals und durch das typische Bandenmuster in der RAPD-PCR als *C. dubliniensis* identifiziert werden. Hier bestätigte sich noch einmal, dass die molekulare Typisierung zur Unterscheidung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* der Unterscheidung aufgrund der Morphologie überlegen ist.

Auffällig war weiterhin, dass von den 22 untersuchten *C. dubliniensis*-Isolaten 11 Isolate einige (bis zu sechs) schwache Banden bei der Hybridisierung mit der CARE2-Sonde zeigten. Auch bei Lischewski et al. wurde gezeigt, dass *C. dubliniensis*-Isolate einige wenige Banden bei der ISH gezeigt hatten (22). Dies könnte auf eine Ungenauigkeit in der Hybridisierung zurückzuführen sein. Wahrscheinlicher erscheint jedoch, dass *C. albicans* und *C. dubliniensis* nicht nur morphologische sondern auch genetische Ähnlichkeiten aufweisen. Es wurde schon die Vermutung geäußert, dass *C. dubliniensis* durch den Selektionsdruck (aufgrund vermehrten Azol-Einsatzes bei AIDS-Patienten) aus *C. albicans* hervorgegangen sei. Ob dies tatsächlich zutrifft, sollte weiter untersucht werden

Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Besiedelung von Geschwisterpaaren gelegt. An dieser Studie nahmen zwei Geschwisterpaare und ein Geschwistertrio teil. Ein Geschwisterpaar wies nur *C. albicans* im Sputum auf. Hier zeigte sich derselbe Genotyp im Verlauf des Untersuchungszeitraumes und zwischen beiden Geschwistern. Man nimmt an, dass die *C. albicans*-Arten der beiden Geschwister höchstwahrscheinlich miteinander verwandt sind, so dass man davon ausgehen kann, dass hier eine Übertragung unter den beiden Geschwistern stattgefunden hat. Allerdings war das Bandenmuster in der Hybridisierung nur eingeschränkt beurteilbar. Es zeigten sich wenige schwache Banden, die allerdings in ihrer Position alle übereinstimmten.

Ein weiteres Geschwisterpaar zeigte außer *C. albicans* auch *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* im Sputum. Der ältere Bruder wird mit Antimykotika behandelt, der andere dagegen nicht. Hier fanden sich in der Hybridisierung unterschiedliche Bandenmuster für die *C. albicans*-Stämme, die wahrscheinlich nicht untereinander verwandt waren.

Die *C. tropicalis*-Isolate zeigten in der PCR gleiche Bandenmuster und gelten somit als höchstwahrscheinlich verwandt. Bei der Untersuchung der *C. dubliniensis*-Isolate zeigten sich 5 Isolate als höchstwahrscheinlich und ein Isolat als möglicherweise mit dem des Bruders verwandt. Hier wird davon ausgegangen, daß bei *C. albicans* keine Erregerübertragung stattgefunden hat. Ob bei *C. dubliniensis* oder bei *C. tropicalis* eine Erregerübertragung stattgefunden hat, kann nicht mit Sicherheit bestimmt werden, da hier nur die PCR vorliegt, die bei diesen beiden *Candida*-Spezies nicht sehr aussagekräftig ist. Die Differenzierung zum Kontrollstamm war jedoch vorhanden. Weiterhin spricht für eine mögliche Transmission, dass *C. tropicalis* nur bei diesen beiden Geschwistern zu finden war. Deswegen liegt die Vermutung nahe, dass dieser, in der vorliegenden Studie ziemlich seltene Keim, von einem Geschwisterteil auf das andere übertragen wurde.

Bei einer dritten Geschwistergruppe, bestehend aus einem älteren Bruder und zwei Zwillingmädchen, zeigte sich, dass beide Zwillingmädchen bei *C. albicans* ähnliche Bandenstrukturen aufwiesen, wie sie auch bei dem Bruder vorkamen. Die Isolate gelten als möglicherweise miteinander verwandt. In drei bzw. fünf Fällen waren die Isolate sogar höchstwahrscheinlich miteinander verwandt. Die beiden Zwillingmädchen hatten in der Genstruktur sehr ähnliche Bandenmuster, so dass hier die Keime höchstwahrscheinlich miteinander verwandt waren. Auch hier wird vermutet, dass eine Erregerübertragung unter den Geschwistern stattgefunden haben könnte. Desweiteren zeigte sich bei dem Bruder und einem der Zwillingmädchen *C. dubliniensis*. Diese beiden Isolate zeigten in der PCR ein ähnliches Bandenmuster und gelten somit als möglicherweise miteinander verwandt.

Eine Übertragung isogener Stämme unter Geschwistern war somit in allen drei Fällen wahrscheinlich.

In der Literatur wurde bis jetzt noch nicht berichtet, ob eine Übertragung isogener *Candida*-Stämme bei Mukoviszidosekranken Geschwistern beobachtet wurde. Jedoch wurden bei HIV- erkrankten Familienmitgliedern solche Untersuchungen schon durchgeführt. Es wurde z. B. die Übertragung eines azolresistenten *C. albicans*-Erregers von den mit Azolen behandelten Kindern auf die noch nicht mit Azolen vorbehandelte Mutter berichtet und die Vermutung geäußert, dass Übertragungen innerhalb der Familie wahrscheinlich durch Kontamination über Essen, Spielzeug und andere

Gebrauchsgegenstände stattfinden (27).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen den Verdacht nahe, dass auch Mukoviszidosekranke Geschwister isogene *Candida*-Stämme untereinander austauschen können. Hier sollte also vermehrt Wert auf Hygiene zur Vermeidung einer Erregerübertragung gelegt werden.

V Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Kolonisationsrate verschiedener *Candida*-Spezies im Respirationstrakt von Kindern und jungen Erwachsenen mit Mukoviszidose. Die *Candida*-Isolate wurden auf Antimykotika-Empfindlichkeit getestet und weiterführende molekularbiologische Untersuchungen zur Persistenz isogenetischer Stämme durchgeführt. Hierzu wurden über einen Zeitraum von 30 Monaten konsekutive, im Rahmen von Routineuntersuchungen bei 56 CF-Patienten entnommene Sputa und Rachenabstriche angezüchtet, eine Speziesdifferenzierung durchgeführt, und die *Candida*-Isolate mittels MHK-Testung auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den Antimykotika Amphotericin B, Flucytosin, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol und Micafungin getestet. Die Untersuchungen zur Persistenz isogenetischer Stämme und

einer möglichen Transmission zwischen Geschwistern wurden mittels molekularer Typisierung durch RAPD-PCR und Southern-Hybridisierung mit der CARE-2 Sonde durchgeführt.

Die häufigste *Candida* spp, *C. albicans*, ließ sich bei 95% der 56 untersuchten Patienten aus dem Respirationstrakt isolieren. Der Anteil der Patienten mit non-*albicans Candida* spp. betrug 55%. *C. dubliniensis* konnte mit 6% bei Mukoviszidose-Patienten im Vergleich zu anderen nicht-HIV-Patienten überdurchschnittlich häufig isoliert werden.

Die Antimykotika-Empfindlichkeit zeigte sich abhängig von den unterschiedlichen *Candida*- Spezies. Bei *C. albicans* zeigte sich in 95% gute Empfindlichkeit auf alle getesteten Antimykotika. Unter Antimykotikatherapie war bei einzelnen Patienten-Isolaten ein Shift zu Antimykotika- resistenten Spezies, wie z.B. *C. glabrata* und *C. kefyr* zu beobachten.

Die Ergebnisse der molekularen Typisierungen zeigten, dass die durchschnittliche Persistenz isogenetischer *C. albicans*-Stämme bei 10 Monaten lag. Auch bei den anderen non-*albicans Candida* Spezies konnte eine Persistenz isogenetischer Stämme nachgewiesen werden. Bei zwei Geschwisterpaaren und einem Geschwistertrio konnten Transmissionen isogenetischer Stämme nachgewiesen werden.

Die hohe Kolonisationsrate mit *Candida* spp. im Respirationstrakt von Mukoviszidose-Pateinten sowie die Persistenz isogenetischer Stämme ist die Grundlage zu weiterführenden Untersuchungen zur Pathogenese und Virulenz, um zu klären, ob Hefen an der chronischen Inflammation und Destruktion der Lunge von Mukoviszidose-Patienten beteiligt sind, und ob sich hieraus in Einzelfällen eine Indikation zu einer antimykotischen Therapie ergibt.

VI Literaturverzeichnis

- (1) Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU et al. **DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting.** Nucleic Acids Res 1992 Oct 11; 1992 Oct.; 20(19):5137-42.
- (2) Araj GF, Daher NK, Tabbarah ZA. **Antifungal susceptibility of *Candida* isolates at the American University of Beirut Medical Center.** Int J Antimicrob Agents 1998 Nov.; 10(4):291-6.
- (3) Bauernfeind A, Bertele RM., Harms K et al. **Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis.** Infection 1987 July; 15(4):270-7.
- (4) Bhargava V., Tomaszefski JF Jr, Stern RC, Abramowsky CR. **The pathology of fungal infection and colonization in patients with cystic fibrosis.** Hum Pathol 1989 Oct.; 20(10):977-86.
- (5) Blaschke-Hellmessen R, Spitzer H, Paul KD, Hoffmann C. **Mycological surveillance of children with cystic fibrosis.** Mycoses 1991; 34 Suppl 1:43-7.
- (6) Bonacorsi SP, Munck A, Gerardin M et al. **In situ management and molecular analysis of candidaemia related to a totally implantable vascular access in a cystic fibrosis patient.** J Infect 1996 July; 33(1):49-51.
- (7) Borg-von Zepelin M, Zaszke K, Gross U et al. **Effect of Micafungin (FK463) on *Candida albicans* adherence to epithelial cells.** Chemotherapy 2002 July; 48(3):148-53.
- (8) Burns JL, Van Daltsen JM, Shawar RM et al. **Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis.** J Infect Dis 1999 May; 179(5):1190-6.

- (9) De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A. **Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity.** Med Mycol 2001 Aug.; 39(4):303-13.
- (10) Doern GV, Brogden-Torres B. **Optimum use of selective plated media in primary processing of respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis.** J Clin Microbiol 1992 Oct.; 30(10):2740-2.
- (11) Dromer F, Improvisi L, Dupont B et al. **Oral transmission of *Candida albicans* between partners in HIV-infected couples could contribute to dissemination of fluconazole-resistant isolates.** AIDS 1997 July; 11(9):1095-101.
- (12) Fahy JV, Keoghan MT, Crummy EJ, FitzGerald MX. **Bacteraemia and fungaemia in adults with cystic fibrosis.** J Infect 1991 May; 22(3):241-5.
- (13) Franz R, Kelly SL, Lamb DC et al. **Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains.** Antimicrob Agents Chemother 1998 Dec.; 42(12):3065-72.
- (14) Galant SP, Rucker RW, Groncy CE et al. **Incidence of serum antibodies to several *Aspergillus* species and to *Candida albicans* in cystic fibrosis.** Am Rev Respir Dis 1976 Aug.; 114(2):325-31.
- (15) Graybill JR. **The echinocandins, first novel class of antifungals in two decades: will they live up to their promise?** Int J Clin Pract 2001 Nov.; 55(9):633-8.
- (16) Haase G, Skopnik H, Groten T et al. **Long-term fungal cultures from sputum of patients with cystic fibrosis.** Mycoses 1991 Sept.; 34(9-10):373-6.
- (17) Hube B. ***Candida albicans* secreted aspartyl proteinases.** Curr Top Med Mycol 1996 Dec.; 7(1):55-69.
- (18) Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Merz WG et al. **Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus**

- (HIV)-infected and non-HIV-infected individuals.** J Clin Microbiol 2000 June; 38(6):2423-6.
- (19) Kerkmann ML, Schuppler M, Paul KD et al. **Red-pigmented *Candida albicans* in patients with cystic fibrosis.** J Clin Microbiol 1999 Jan.; 37(1):278.
- (20) Kusenbach G, Skopnik H, Haase G et al. ***Exophiala dermatitidis* pneumonia in cystic fibrosis.** Eur J Pediatr 1992 May; 151(5):344-6.
- (21) Lasker BA, Page LS, Lott TJ, Kobayashi GS. **Isolation, characterization, and sequencing of *Candida albicans* repetitive element 2.** Gene 1992 July; 116(1):51-7.
- (22) Lischewski A, Harmsen D, Wilms K et al. **Molecular epidemiology of *Candida albicans* isolates from AIDS and cancer patients using a novel standardized CARE-2 DNA fingerprinting technique.** Mycoses 1999; 42(5-6):371-83.
- (23) Magaldi S, Mata S, Hartung C et al. **In vitro susceptibility of 137 *Candida sp.* isolates from HIV positive patients to several antifungal drugs.** Mycopathologia 2001; 149(2):63-8.
- (24) Maiz L, Cuevas M, Quirce S et al. **Serologic IgE immune responses against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in patients with cystic fibrosis.** Chest 2002 Mar.; 121(3):782-8.
- (25) Melo AS, de Almeida LP, Colombo AL, Briones MR. **Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD).** Mycopathologia 1998; 142(2):57-66.
- (26) Millon L, Manteaux A, Reboux G et al. **Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype.** J Clin Microbiol 1994 Apr.; 32(4):1115-8.
- (27) Muller FM, Kasai M, Francesconi A et al. **Transmission of an azole-resistant isogenic strain of *Candida albicans* among human immunodeficiency virus-**

- infected family members with oropharyngeal candidiasis.** J Clin Microbiol 1999 Oct.; 37(10):3405-8.
- (28) Muller FM, Kurzai O, Hacker J et al. **Effect of the growth medium on the in vitro antifungal activity of micafungin (FK-463) against clinical isolates of *Candida dubliniensis*.** J Antimicrob Chemother 2001 Nov.; 48(5):713-5.
- (29) Muller FM, Lischewski A, Harmsen D, Hacker J. **Standardized molecular typing.** Mycoses 1999; 42 Suppl 2:69-72.
- (30) National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A.** Wayne, National Committee for Clinical Laboratory Standards . 1997.
Ref Type: Electronic Citation
- (31) Pelletier R, Loranger L, Marcotte H, De Carolis E. **Voriconazole and fluconazole susceptibility of *Candida* isolates.** J Med Microbiol 2002 June; 51(6):479-83.
- (32) Peltroche-Llacsahuanga H, Dohmen H, Haase G. **Recovery of *Candida dubliniensis* from sputum of cystic fibrosis patients.** Mycoses 2002 Feb.; 45(1-2):15-8.
- (33) Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ et al. **In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of *Candida spp.*** Antimicrob Agents Chemother 2002 June; 46(6):1723-7.
- (34) Przyklenk B, Bauernfeind A, Horl G, Emminger G. **Serologic response to *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis.** Infection 1987 July; 15(4):308-10.
- (35) Quindos G, Carrillo-Munoz AJ, Arevalo MP et al. **In vitro susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents.** Chemotherapy 2000 Nov.; 46(6):395-401.

- (36) Rambali B, Fernandez JA, Van Nuffel L et al. **Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: a process analysis of test variables.** J Antimicrob Chemother 2001 Aug.; 48(2):163-77.
- (37) Reiss E, Tanaka K, Bruker G et al. **Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections.** Med Mycol 1998; 36 Suppl 1:249-57.
- (38) Rex JH, Pfaller MA, Barry AL et al. **Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group.** Antimicrob Agents Chemother 1995 Jan.; 39(1):40-4.
- (39) Rowen JL, Tate JM, Nordoff N et al. ***Candida* isolates from neonates: frequency of misidentification and reduced fluconazole susceptibility.** J Clin Microbiol 1999 Nov.; 37(11):3735-7.
- (40) Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Engelmann E, Trautmann M. **Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy.** J Clin Microbiol 1996 Dec.; 34(12):3208-11.
- (41) Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Morschhauser J. **Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS.** J Antimicrob Chemother 2000 Aug.; 46(2):291-5.
- (42) Sordelli DO, Cassino RJ, Macri CN et al. **Phagocytosis of *Candida albicans* by alveolar macrophages from patients with cystic fibrosis.** Clin Immunol Immunopathol 1982 Feb.; 22(2):153-8.
- (43) St-Germain G, Laverdiere M, Pelletier R et al. **Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canada.** J Clin Microbiol 2001 Mar.; 39(3):949-53.

- (44) Staib P, Morschhauser J. **Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis***. Mycoses 1999; 42(9-10):521-4.
- (45) Steffan P, Vazquez JA, Boikov D et al. **Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates**. J Clin Microbiol 1997 Aug.; 35(8):2031-9.
- (46) Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA et al. ***Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals**. Microbiology 1995 July; 141(Pt 7):1507-21.
- (47) Wong-Beringera A, Hindler J, Brankovic L et al. **Clinical applicability of antifungal susceptibility testing on non-*Candida albicans* species in hospitalized patients**. Diagn Microbiol Infect Dis 2001 Jan.; 39(1):25-31.
- (48) Zhang J, Hollis RJ, Pfaller MA. **Variations in DNA subtype and antifungal susceptibility among clinical isolates of *Candida tropicalis***. Diagn Microbiol Infect Dis 1997 Mar.; 27(3):63-7
- (49) Legrand M, Lephart P, Forche A, Mueller FM, Walsh T, Magee PT, Magee BB. **Homozygosity at the MTL locus in clinical strains of *Candida albicans*: karyotypic rearrangements and tetraploid formation**. Mol Microbiol. 2004 Jun.; 52(5):1451-6

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei all denen bedanken, die mich bei meiner Doktorarbeit auf so vielfältige Weise unterstützt haben:

Zu Anfang möchte ich mich bei meinem Doktorvater Priv.-Doz. Frank-Michael Müller bedanken, für die jahrelange Betreuung und die Geduld, sowie für die vielen Tipps und das Korrekturlesen.

Vielen Dank auch an Frau Dr. Alexandra Hebestreit für die klinischen Angaben zu den Patienten und die Probeentnahmen.

Ebenso vielen Dank an Herrn Uwe Ziegler vom Missionsärztlichen Institut in Würzburg für die klinischen Angaben zu den Patienten.

Dank auch an das Laborteam des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie, das im Rahmen der Routinediagnostik Isolate angezchtet und identifiziert hat.

Danke an Frau Andrea Staudigel, die mich in die Grundkenntnisse der Laborarbeit eingewiesen hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Danke an alle am Institut für Molekulare Infektionsbiologie, die mit mir das Labor geteilt haben, für die gute Zusammenarbeit

Besonderen Dank gilt meinen Eltern und meiner Oma für die finanzielle Unterstützung während des Studiums und die Aufmunterungen, wenn mal wieder ein Versuch nicht geklappt hat.

Zuletzt noch herzlichen Dank an meinen Freund Burkhard, der mich (fast) nie mit der Frage belästigt hat, wann denn die Doktorarbeit endlich fertig sei.

Michaela Muthig
Dahlienweg 12
97816 Lohr am Main

Tel. (06023) 915690
e-mail: michaela.muthig@freenet.de

Lebenslauf

Persönliche Daten

geb. am 08.03.1977 in Lohr am Main
ledig

Schulbildung

09/1984 – 07/1987	Grundschule Sendelbach
09/1987 – 06/1996	Franz-Ludwig-von-Erthal-Gymnasium Lohr, Abitur, Note 1,6

Studium

10/1996 – 10/2003	Medizinstudium an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg, Ärztliche Prüfung, Gesamtnote 2,16
-------------------	--

Berufliche Erfahrungen

01/2004 – 09/2004	AIP im Kreiskrankenhaus Wasserlos, Innere Abteilung
seit 10/2004	Assistenzärztin in der Inneren Abteilung

Zusatzqualifikationen

Sprachen:	Englisch (gut) Französisch (Grundkenntnisse)
EDV-Kenntnisse:	MS-Excel und MS-Word (sehr gut) Intra- und Internet (ständig in Anwendung)

