

Empfindlichkeitsprüfung von *Candida* Species unter Anwendung des kommerziellen Agardiffusionsverfahrens mit LD 2-Ringen für die Routinediagnostik

Susceptibility testing of *Candida* species using the commercial agar diffusion test with LD 2-rings for routine diagnostics

Sabine Dankmeier¹, Bilal Al-Nawas², P.M. Shah³

Zusammenfassung: Die steigende Zahl von Pilzinfektionen, die Entwicklung und Einführung neuer antimykotischer Substanzen sowie die Möglichkeit der Resistenzentwicklung unter Therapie mit Antimykotika haben in der Vergangenheit zu einem ständig wachsenden Bedarf an standardisierten Verfahren zur Empfindlichkeitstestung von pathogenen Pilzen geführt. Hierbei entstand unter anderem eine Vielzahl kommerzieller Testverfahren, bei denen mit Hilfe vorgefertigter Testkits eine einfache und schnelle Durchführung der Empfindlichkeitsprüfung erzielt werden soll. Eine dieser Methoden, welche in manchen Laboratorien in Deutschland angewendet wird, ist das so genannte LD 2 Ring-Verfahren, welches auf dem Prinzip der Agardiffusion beruht unter Verwendung vorgefertigter, antimykotika-beschichteter Papierringe. In der vorliegenden Arbeit wird dieses Verfahren auf seine Reproduzierbarkeit bei der Testung von zehn Qualitätskontrollstämmen hin überprüft. Die Ergebnisse zeigen eine starke Schwankungsbreite und somit eine schlechte Reproduzierbarkeit, so dass dieses Verfahren zwar für die Bearbeitung von wissenschaftlichen Fragestellungen, nicht jedoch für die Routinetestung als geeignet angesehen werden kann.

Des Weiteren erfolgte eine Untersuchung auf das Vorliegen eines so genannten „minor error“, man erhält für einen sensiblen Stamm das Ergebnis „resistent“, „major error“, man erhält für einen intermediären Stamm das Ergebnis „sensibel“, und „very major error“, man erhält für einen resistenten Stamm das Ergebnis „sensibel“. Hierbei kam es in 16,25 % der untersuchten Fälle zum Vorliegen eines „minor errors“. Ein „major error“ wurde nicht beobachtet.

Schlüsselwörter: Empfindlichkeitstestung; *Candida*; Agardiffusion; LD 2 Ringe.

Summary: The increasing number of fungal infections, development and introduction of new antifungal agents as well as the possibility of development of resistance under therapy with antifungal agents led to a constantly increasing demand for standardized methods for susceptibility testing of pathogenic yeasts in the past. A large number of commercial tests was developed, aimed at fast and easy handling of susceptibility testing with the help of prepared test kits. One of these methods used in some routine laboratories in Germany is the so-called LD 2 rings-method, which is based on the principle of agar diffusion using prepared paper rings coated with the antifungal agent. In the following study, this method is investigated as to its reproducibility by testing ten quality-control strains. The results show great variations and consequently a bad reproducibility, so that although this method can be used for investigating scientific questions, it cannot be considered suitable for routine susceptibility testing.

Additionally, the “minor error” (the test result for a sensitive strain is “resistant”), “major error” (the test result for an intermediate strain is “sensitive”), and “very major error” (the test result for a resistant strain is “sensitive”) was analysed. Here for, 16,25 % of the investigated cases showed the existence of a “minor error”. No “major error” was observed.

Keywords: susceptibility testing; *Candida*; agar diffusion; LD 2 rings.

Die steigende Zahl von Pilzinfektionen, die Entwicklung und Einführung neuer antimykotischer Substanzen sowie die Möglichkeit der Resistenzentwicklung unter Therapie mit Antimykotika haben in der Vergangenheit zu einem ständig wachsenden Bedarf an standardisierten Verfahren zur Empfindlichkeitstestung von pathogenen Pilzen geführt. Wichtige Gründe für die Durchführung einer aussagekräftigen Empfindlichkeitsprüfung sind zum einen die damit verbundene Möglichkeit, eine Voraussage bezüglich Empfindlichkeit oder Resistenz des entsprechenden Keimes zu

¹Kliniken des Main-Taunus-Kreises GmbH, Medizinische Klinik III, Hofheim; ²Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Klinikum der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz; ³Zentrum der Inneren Medizin, Schwerpunkt Infektiologie, am Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main

Korrespondenz: Prof. Dr. med. Pramod M. Shah, Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Zentrum der Inneren Medizin, Med. Klinik III/Schwerpunkt: Infektiologie
Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt, Deutschland
Eingegangen: 16. 1. 2003/Angenommen: 15. 5. 2003

treffen, des Weiteren die Auswahl des für den jeweiligen Keim aktivsten Antimykotikums zu optimieren sowie Ursachen eines eventuellen klinischen Therapieversagens zu finden. Die *in-vitro*-Testung pathogener Pilze wird von vielen Faktoren beeinflusst, so zum Beispiel vom unterschiedlichen Wachstumsverhalten der Keime, den Eigenschaften der einzelnen Antimykotika wie Löslichkeit, Stabilität und Wirkungsweise sowie den Testbedingungen, welche unter anderem die Zusammensetzung und den pH-Wert des Mediums, Art, Größe und Herstellung des Inoculums, Inkubationsdauer und -temperatur sowie Kriterien der Endpunktbestimmung beinhalten [1]. Während für die Empfindlichkeitstestung antibakterieller Substanzen schon seit einiger Zeit bewährte standardisierte Methoden existieren, treten bei der Prüfung von Antimykotika immer wieder Probleme auf, die einerseits zu einer schlechten Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors und andererseits zu nur geringen Übereinstimmungen von Testergebnissen zwischen verschiedenen Labors führen.

Aus diesem Grund begannen zahlreiche Versuche, standardisierte Verfahren zur Empfindlichkeitsprüfung pathogener Hefen zu entwickeln [2, 3]. Hierbei entstand unter anderem eine Vielzahl kommerzieller Testverfahren, bei denen mit Hilfe vorgefertigter Testkits eine einfache und schnelle Durchführung der Empfindlichkeitsprüfung erzielt werden soll, wie zum Beispiel PASCO® [4], Fungitest® [5, 6], Mycototal®, Mycostandard®, ATB Fungus®, Candifast® [7], Sensititre Yeast One-Methode [8] und Etest® [9]. Eine dieser Methoden, welche in manchen Laboratorien in Deutschland angewendet wird, ist das sogenannte LD 2 Ring-Verfahren [10]. Es beruht auf dem Prinzip der Agardiffusion, wobei vorgefertigte, mit definierten Antimykotika-Konzentrationen beschichtete Papierringe verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit soll am Beispiel des LD 2 Ring-Verfahrens aufgezeigt werden, welche Probleme sich bei der Anwendung solcher kommerzieller, nicht validierter Testmethoden ergeben können, die in oben genanntem Fall sogar den Schluss nach sich ziehen, dass dieses Verfahren für die Routinetestung nicht als geeignet angesehen werden kann.

Material und Methoden

Organismen

Es wurden zehn Qualitätskontroll-Stämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) verwendet, die entsprechende ATCC®-Bezeichnung erscheint, soweit vorhanden, in Klammern: *Candida albicans* 1386 (10 231), 1665 (2091), 5817 (10 259), 6569 (14 053), 11 225 (90 028), *Candida glabrata* 6425, 11 226 (90 030), *Candida parapsilosis* 11 224 (90 018) und *Issatchenkia orientalis* 6128 (6258), 70 079. Alle Stämme wurden vor Durchführung der Tests frisch auf Sabouraud-Agarplatten (Becton Dickinson, Heidelberg) überimpft und 24 Stunden bei 37 °C bebrütet.

Herstellung der Übernachtskultur

Mit einer sterilen Impföse wurden jeweils ein bis zwei Kolonien eines frisch kultivierten Hefestammes in 5 ml Sabouraud-Bouillon (Merck, Darmstadt) überimpft und anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Agardiffusionsmethode unter Verwendung von LD 2-Ringen

Aus einer 24 Stunden alten Hefe-Kultur wurden mit einer sterilen Impföse Kolonien entnommen, in 0,9%ige NaCl-Lösung überführt und auf einen McFarland-Standard 3–4 eingestellt. Als Medium wurden Mycoplate-Agarplatten (Heipha Diagnostika, Heidelberg, Zusammensetzung in g/l: Ammoniumsulfat 3,5 g, Kaliumphosphat 1 g, NaCl 0,1 g, Mg-Sulfat 0,5 g, Glukose 10 g, L-Histidin 10 mg, Tryptophan 20 mg, Methionin 20 mg, Asparagin 1,5 g, Agar 20 g, Vitamine, Salzlösung pH 5,6±0,2) verwendet. Für die Stämme *C. albicans* DSMZ 5817 und *I. orientalis* DSMZ 70 079 mussten die Tests auf RPMI-Agarplatten (Heipha Diagnostika, Heidelberg) durchgeführt werden, da sie auf Mycoplate-Agar kein Wachstum zeigten. Eine vergleichende Untersuchung der Bestimmung von Hemmhofdurchmessern bei Verwendung von Mycoplate-Agarplatten und RPMI-Agarplatten wurde nicht durchgeführt. Zur Beimpfung wurde das Inoculum mit einem sterilen Tupfer gleichmäßig in drei Richtungen auf dem Agar ausgestrichen, die Platten blieben anschließend etwa 30 min bei Raumtemperatur stehen. Dann wurde mit einer sterilen Pinzette jeweils ein mit Antimykotika beschichteter Papier-Ring (LD 2-Ring: Amphotericin B 20 µg, Clotrimazol 10 µg, Econazol 10 µg, Flucytosin 1 µg, Ketoconazol 10 µg, Miconazol 10 µg, Natamycin 10 µg, Nystatin 100 IU, Durchmesser der einzelnen am Ring befestigten Testblättchen: 7 mm, Abtek Biologicals Ltd., Liverpool, Schottland, Vertrieb durch Innogenetics GmbH, Heiden; es wurden zwei verschiedene Chargen verwendet) aufgelegt und mit dem getränkten Tupfer vorsichtig angedrückt. Die Platten wurden verschlossen und bei 37 °C bebrütet. Die Ablesung durch Ausmessen der Hemmhöfe mit einem speziell dafür vorgesehenen Lineal erfolgte nach 24 und 48 Stunden (Tab. 1). Die Empfindlichkeitstestung wurde für jeden Stamm insgesamt zehnmal durchgeführt. Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte als deskriptive Darstellung unter Angaben von Minimum, Maximum, Mittelwert sowie der Varianz. Bei der Bestimmung der Mittelwerte wurde für Werte „> 50 mm“ mit 50 mm gerechnet.

Mit Blick auf die klinische Relevanz der möglicherweise auftretenden Abweichung der Testergebnisse von bekannten literaturbasierten Resistenzdaten wurden die Ergebnisse wie folgt interpretiert: „minor error“ – man erhält für einen sensiblen Stamm das Ergebnis „resistent“, „major error“ – man erhält für einen intermediären Stamm das Ergebnis „sensibel“, und „very major error“ – man erhält für einen resistenten Stamm das Ergebnis „sensibel“. Von den hier insgesamt getesteten 80 Kombinationen aus Antiinfektivum und Stamm existie-

Tabelle 1 Bewertung der Hemmhofgrößen [10]

ANTIMYKOTIKUM	HEMMHOF in mm nach 24 h			HEMMHOF in mm nach 48 h		
	resistent	intermediär	sensibel	resistent	intermediär	sensibel
Amphotericin B	< 10	10	> 10	< 10	10	> 10
Clotrimazol	< 10	10–16	> 16	< 10	10–14	> 14
Econazol	< 10	10–20	> 20	< 12	12–15	> 15
Flucytosin	< 15	15–25	> 25	< 15	15–25	> 25
Ketoconazol	< 10	10–16	> 16	< 10	10–12	> 12
Miconazol	< 10	10–16	> 16	< 12	12–15	> 15
Natamycin	< 6	6–10	> 10	< 6	6–10	> 10
Nystatin	< 20	20	> 20	< 20	20	> 20

ren in der Literatur für 12 Kombinationen Referenzwerte für die Empfindlichkeit. Es handelt sich dabei um die Stämme 6128, 11 224, 11 225, 11 226 und die Substanzen Amphotericin B, Ketoconazol und Flucytosin. So stehen für 15 % der Fälle Referenzwerte zur Verfügung, die zur Berechnung eines möglichen major oder minor error verwendet werden können.

Ergebnisse

Bei der Testung von Amphotericin B mittels LD 2-Ring-Methode (Tab. 2) reagierten alle Stämme sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden empfindlich auf Amphotericin B mit Ausnahme von *I. orientalis* DSMZ 6128, welcher sich in drei von zehn Versuchen nach 48 Stunden resistent zeigte, sowie *C. parapsilosis* DSMZ 11 224, für den die Werte bei drei Versuchen nach 48 Stunden im intermediären Bereich lagen. Die Standardabweichung betrug nach 24 Stunden maximal 13,03 mm, nach 48 Stunden nur noch maximal 2,20 mm*). Hieraus lässt sich für die Hemmhofbestimmung von Amphotericin B auf eine gute Reproduzierbarkeit der LD 2 Ring-Methode schließen. Da Amphotericin B gegen alle hier getesteten Stämme wirksam sein soll [3, 11, 13–25] ergibt sich in vier von 200 Fällen (2 %) ein „minor error“, in zusätzlich 18 von 200 Fällen (9 %) „intermediär“ statt sensibel, somit potenziell ein „minor error“.

Bei der Testung von Flucytosin (Tab. 2) zeigten sich die Stämme *I. orientalis* DSMZ 6128 und 70 079 sowie *C. albicans* DSMZ 11 225 nach 48 Stunden resistent, die übrigen Stämme reagierten empfindlich. Allerdings kam es hier teilweise zu erheblichen Schwankungen der Werte zwischen den einzelnen Versuchen. So ergab sich zum Beispiel für *C. albicans* DSMZ 11 226 eine Spanne von 0 bis ≥ 50 mm, für *C. albicans* DSMZ 11 225 von 0 bis 32 mm und für *I. orientalis* DSMZ 6128 von 0 bis 18 mm. Die Standardabweichung betrug nach 24 Stunden bis zu 12,18 mm, nach 48 Stunden bis zu

12,70 mm*). Dies hat für die Auswertung zur Folge, dass sich für einen Stamm Ergebnisse im Bereich von „sensibel“ bis „resistent“ ergeben können. Aufgrund der hierdurch deutlich schlechten Reproduzierbarkeit kann die Anwendung der LD 2-Ring-Methode für die Empfindlichkeitsprüfung von Flucytosin nicht als geeignet angesehen werden. Übereinstimmend mit den Literaturdaten stellt sich *Issatchenkia orientalis* (6128 und 70 079) resistent dar [11, 14, 17–19, 21, 22]. Die übrigen Stämme sollten sensibel sein (*C. parapsilosis* 11 224, *C. albicans* 11 225, *C. glabrata* 11 226) [3, 14–18, 22, 24, 25]. Es fanden sich in 18 von 160 (8 sensible Stämme mal 10 Versuche mal zwei Zeiten) ein „minor error“ (11,25 %), in 15 von 160 Fällen (9,4 %) „intermediär“ statt sensibel, somit potenziell ein „minor error“.

Auch bei der Empfindlichkeitsprüfung von Ketoconazol (Tab. 2) tauchte das Problem auf, dass sich bei der Testung jeweils eines Stammes große Schwankungen zwischen den Werten der einzelnen Versuche ergaben. So lagen zum Beispiel die Ergebnisse für *C. albicans* DSMZ 1665 und *C. glabrata* DSMZ 6425 in einem Bereich von 0 bis > 50 mm, für *C. albicans* DSMZ 1386 von 0 bis 24 mm. Es ergaben sich nach 24 Stunden Standardabweichungen bis zu 19,52 mm und nach 48 Stunden bis zu 13,41 mm*). Während diese große Schwankungsbreite bei den beiden *C. albicans*-Stämmen nur nach 24 Stunden auftrat, nach 48 Stunden jedoch in allen Versuchen Resistenz bestand, lieferte die Testung des *C. glabrata*-Stammes auch nach 48 Stunden Qualitäten von „sensibel“ bis „resistent“. Somit kann die LD 2 Ring-Methode auch für die Empfindlichkeitsprüfung der Hefen gegenüber Ketoconazol nicht als geeignet bezeichnet werden. Laut Referenzangaben sind alle getesteten Stämme sensibel [11, 14, 15, 21, 25], allerdings sind höhere MHK Werte für *C. glabrata* bekannt [3]. Es ergab sich hier in 69 von 200 Fällen (34,5 %) ein „minor error“ und in 6 von 200 Fällen (3 %) „intermediär“ statt sensibel, somit potenziell ein „minor error“.

Für die übrigen getesteten Antimykotika Clotrimazol, Econazol, Miconazol, Natamycin und Nystatin (Tab. 2 und 3) ergaben sich dieselben Probleme wie

*) (nicht tabellarisch dargestellt)

Tabelle 2 Hemmhofbereiche in mm, Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser in mm und Varianzen in Prozent Standardabweichung vom Mittelwert für Amphotericin B, Flucytosin, Ketoconazol, Clotrimazol

STAMM	ZEIT	Amphotericin B			Flucytosin			Ketoconazol			Clotrimazol		
		BEREICH	MWT	VAR	BEREICH	MWT	VAR	BEREICH	MWT	VAR	BEREICH	MWT	VAR
DSMZ 1386	24 h	16–20	19,2	7,29	30 –> 50	44,6	19,84	0–24	11,4	92,89	0–20	12,8	57,66
<i>C. albicans</i>	48 h	14–20	17,8	11,18	0–30	25,8	36,09	0–0	0	0	0–0	0	0
DSMZ 1665	24 h	16 –> 50	25,4	51,30	30 –> 50	48,0	13,17	0 –> 50	38,2	51,10	0 –> 50	22	73,73
<i>C. albicans</i>	48 h	16–20	18,8	8,99	0–34	20,2	42,62	0–0	0	0	0–10	2	211
DSMZ 5817	24 h	22–28	24,6	6,71	26–32	29,4	6,46	30–36	31,8	6,26	22–30	28	11,68
<i>C. albicans</i>	48 h	22–26	24,0	5,54	22–30	26,6	10,68	0–30	19,0	70,58	20–30	24,4	12,71
DSMZ 6128	24 h	8–12	10,0	9,40	0–18	7,4	91,89	18–24	21,4	9,91	22–28	23,6	9,62
<i>I. orientalis</i>	48 h	8–10	9,4	10,32	0–10	3,4	133,24	18–22	19,2	7,29	20–22	20,8	4,95
DSMZ 6425	24 h	20 –> 50	27,6	43,04	> 50 –> 50	> 50	0	0 –> 50	36,8	51,06	0 –> 50	28,2	58,90
<i>C. glabrata</i>	48 h	18–22	20,6	8,01	34 –> 50	42,4	15,85	0–24	7,6	134,08	0–20	7,2	95,56
DSMZ 6569	24 h	16–20	17,8	6,40	28–40	33,8	15,89	0–30	15,2	72,63	0–20	15	41,8
<i>C. albicans</i>	48 h	14–18	16,2	10,80	0–32	26,8	35,37	0–0	0	0	0–8	0,8	316,25
DSMZ 11 224	24 h	14 –> 50	18,2	61,81	40 –> 50	49,0	6,45	34 –> 50	48,4	10,45	28 –> 50	36,6	21,72
<i>C. parapsilosis</i>	48 h	10–14	12,0	13,58	18 –> 50	43,8	25,14	32 –> 50	48,2	11,80	22–40	30	19,63
DSMZ 11 225	24 h	16–20	17,6	8,98	0–32	18,0	67,67	0–38	23,2	45,99	18–30	24	17,58
<i>C. albicans</i>	48 h	14–18	16,0	10,19	0–0	0	0	0–18	4,6	162,83	0–0	0	0
DSMZ 11 226	24 h	12–20	17,8	13,43	28 –> 50	40,4	22,48	0–30	15,0	74,73	0–16	8	74,5
<i>C. glabrata</i>	48 h	12–18	16,2	13,58	0 –> 50	30,2	42,05	0–0	0	0	0–10	1,6	218,75
DSMZ 70 079	24 h	18–22	19,6	6,43	0–0	0	0	28–32	30,2	3,77	24 -30	27	8
<i>I. orientalis</i>	48 h	14–18	16,2	7,04	0–0	0	0	28–30	29,6	2,84	22–24	22,6	4,29

Tabelle 3 Hemmhofbereiche in mm, Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser in mm und Varianzen in Prozent Standardabweichung vom Mittelwert für Econazol, Miconazol, Natamycin, Nystatin

STAMM	ZEIT	Econazol			Miconazol			Natamycin			Nystatin		
		BEREICH	MWT	VAR	BEREICH	MWT	VAR	BEREICH	MWT	VAR	BEREICH	MWT	VAR
DSMZ 1386	24 h	0–24	16	46	10–24	16,8	23,93	18–26	22,2	10,77	20–26	23	7,39
<i>C. albicans</i>	48 h	0–14	3,4	164,12	0–14	2,6	211,54	16–26	21,4	12,48	16–20	17,6	7,16
DSMZ 1665	24 h	0 –> 50	21	84,52	16 –> 50	25,8	49,77	18 –> 50	28,2	42,09	24 –> 50	30,8	33,28
<i>C. albicans</i>	48 h	0–16	5,2	132,31	10–18	13,8	17,32	16–26	22,2	14,37	18–26	21,1	10,14
DSMZ 5817	24 h	22–30	28	11,68	20–26	23	8,43	14–20	17,6	8,98	26–28	27	3,89
<i>C. albicans</i>	48 h	14–30	23,2	18,28	16–22	20	9,45	0–18	12,4	69,19	26–28	27	3,89
DSMZ 6128	24 h	18–22	19,8	7,47	18–22	20,6	6,55	22–28	25	6,8	18–24	20,2	7,33
<i>I. orientalis</i>	48 h	14–20	16,8	11,49	16–20	17,4	7,76	18–28	22,4	13,17	16–18	17	6,18
DSMZ 6425	24 h	30 –> 50	45,2	17,61	30 –> 50	37	25,14	20 –>50	30,8	34,51	30 –> 50	34	24,79
<i>C. glabrata</i>	48 h	0–40	28,4	40,35	26–32	30	6,3	20–30	25,2	15,95	26–30	28	5,82
DSMZ 6569	24 h	0–26	16,6	42,89	16–24	20	12,45	16–24	21	13,67	20–24	22,4	5,63
<i>C. albicans</i>	48 h	0–12	1,2	315,83	0–12	3,4	161,18	14–24	19,6	19,13	16–20	17,8	8,31
DSMZ 11 224	24 h	24 –> 50	41	28,56	30 –> 50	33	18,79	18 –> 50	25,4	36,57	20 –> 50	25,8	3,40
<i>C. parapsilosis</i>	48 h	16 –> 50	36,2	40,97	24–30	28,2	6,21	18–28	21,4	14,63	14–22	19,4	13,76
DSMZ 11 225	24 h	18–30	25	19,68	16–26	21,4	16,50	16–22	20,2	11,83	20–26	22,2	8,96
<i>C. albicans</i>	48 h	0–18	9,6	86,67	12–18	16,2	15,86	14–22	19,2	15,68	16–20	18,4	6,85
DSMZ 11 226	24 h	0–32	26,2	35,69	22–30	26,8	10,07	18–26	23,8	10,04	22–30	25,6	8,87
<i>C. glabrata</i>	48 h	0–20	7	135,57	22–28	25	10,16	18–24	22,4	9,24	20–26	23,2	7,28
DSMZ 70 079	24 h	16–24	20,8	11,30	14–20	16,4	11,22	16–20	17,8	6,40	22–26	24,2	4,71
<i>I. orientalis</i>	48 h	10–16	12,4	16,69	10–12	11,2	9,20	14–18	16,2	7,04	22–24	23	4,57

oben bereits dargestellt: Bei den Versuchen mit Clotrimazol, Econazol und Miconazol kam es ebenfalls bei einigen Stämmen zu starken Schwankungen der Ergebnisse zwischen den einzelnen Versuchen mit Bereichen von 0 bis > 50 mm Hemmhofgröße, wodurch sich wiederum Empfindlichkeitsstufen von „sensibel“ über „intermediär“ bis „resistent“ für einen Stamm ergaben. Die Prüfung von Natamycin ergab zwar auch Abweichungen zwischen den Hemmhofgrößen der einzelnen Versuche jeweils eines Stammes, hierbei waren die Stämme jedoch fast alle, mit Ausnahme von *C. albicans* DSMZ 5817, eindeutig als empfindlich zu identifizieren. Die Ergebnisse der Testung von Nystatin zeigten insgesamt eine bessere Reproduzierbarkeit als die oben genannten Antimykotika. Allerdings kam es auch hier bei einigen Stämmen, *C. albicans* DSMZ 1665, *C. glabrata* DSMZ 6425 und *C. parapsilosis* DSMZ 11 224, zu vereinzelt „Ausreißern“, des Weiteren ließ sich für einen Teil der Stämme auch hier die jeweilige Empfindlichkeitsqualität nicht eindeutig festlegen, da die Ergebnisse zum Teil von „sensibel“ bis „resistent“ reichten. Das Problem der erschwerten Bewertung der Ergebnisse durch Mikrokolonien innerhalb der Hemmhöfe ergab sich bei keinem der hier beschriebenen Versuche. Zusammenfassend ergibt sich in 91 von 560 Fällen (16,25 %) ein „minor error“ und in zusätzlich 39 von 560 Fällen (6,96 %) ein potentieller „minor error“.

Diskussion

Der ständig wachsende Bedarf an standardisierten Verfahren zur Empfindlichkeitstestung von pathogenen Pilzen hat zur Entwicklung einer großen Anzahl verschiedener Testmethoden geführt. Besonderer Wert für die Anwendung solcher Tests im Arbeitsalltag eines Routinelabors wurde hierbei zum einen auf die möglichst geringen Anschaffungskosten des Testmaterials gelegt, zum anderen auf eine schnelle und einfache sowie reproduzierbare Durchführung der Testmethode. Dass unter diesen Gesichtspunkten Schwierigkeiten bezüglich der Eignung eines solchen Testverfahrens zu Tage treten, wird in der vorliegenden Arbeit deutlich gezeigt.

Die hier getestete LD 2 Ring-Methode ist zwar ein kostengünstiges, einfaches und schnell durchführbares Verfahren mit geringem Arbeitsaufwand, diese Vorteile gehen aber auf Kosten der Reproduzierbarkeit. Wie in den oben beschriebenen Versuchen gezeigt, unterliegen die Ergebnisse der einzelnen Versuche zum Teil so großen Schwankungen, dass für einen Stamm Empfindlichkeitsbereiche von „sensibel“ bis „resistent“ auftreten und somit ein eindeutiges Ergebnis gar nicht festgelegt werden kann, was dieses Verfahren für die Testung von *Candida* Species völlig ungeeignet macht.

Bei den oben beschriebenen Ergebnissen tritt mehrfach der sogenannte „minor error“ auf, wie zum Beispiel bei der Testung von Ketoconazol für die Stämme *C. albicans* DSMZ 1386, 1665, 6569 und *C. glabrata* DSMZ 11 226, oder bei Amphotericin B für *I. orientalis*

DSMZ 6128. Ein eindeutiger „major error“ kann zwar nicht nachgewiesen werden, bei der Testung von Flucytosin kommt es jedoch bei dem als resistent bekannten Stamm *I. orientalis* DSMZ 6128 [11] nach 24 Stunden zu Werten im Bereich von „resistent“ bis „intermediär“, das heißt, bei der routinemäßigen Testung, bei der ja jeder Stamm nur einmal geprüft wird, könnte durchaus „intermediär“ als definitives Ergebnis auftreten, was für die Therapie weitreichende Konsequenzen haben kann.

Die hier untersuchte Methode erweist sich in vielen Fällen als nicht reproduzierbar, da die Abweichung bei der Mehrzahl der Substanzen erheblich ist. Andere in der Literatur beschriebene Methoden eignen sich aufgrund ihrer besseren Reproduzierbarkeit eher zur Empfindlichkeitstestung von *Candida* Species in der Routinediagnostik. Hier sind insbesondere folgende Methoden zu nennen: Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mittels Makro- oder Mikrodilutionsmethode nach den Richtlinien des NCCLS [3], die colorimetrische Makrodilutionsmethode unter Zugabe eines Farbindikators [12] sowie das E-Test[®]-Verfahren [9], welches auf dem Prinzip der Agardiffusion unter Verwendung eines mit einem definierten Gradienten des zu testenden Antimykotikums beschickten Kunststoff-Streifens beruht.

Literatur

1. Sheehan DJ, Espinel-Ingroff A, Moore LS, Webb CD. Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: A Brief Overview. Clin Infect Dis 1993;17(Suppl. 2):494–500.
2. Cormican MG, Pfaller MA. Review: Standardization of antifungal susceptibility testing. J Antimicrob Chemother 1996;38:561–78.
3. NCCLS, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. NCCLS document M27-A 1997;17(9):1–29.
4. Arthington-Skaggs BA, Motley M, Warnock DW, Morrison CJ. Comparative Evaluation of PASCO and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Broth Microdilution Methods for Antifungal Drug Susceptibility Testing of Yeasts. J Clin Microbiol 2000;38(6):2254–60.
5. Davey KG, Holmes AD, Johnson EM, Szekely A et al. Comparative Evaluation of FUNGITEST and Broth Microdilution Methods for Antifungal Drug Susceptibility Testing of *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 1998; 36(4):926–30.
6. Witthuhn F, Toubas D, Beguinot I, Aubert D et al. Evaluation of the Fungitest Kit by Using Strains from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients: Study of Azole Drug Susceptibility. J Clin Microbiol 1999;37(3):864–6.
7. Druetta A, Freydiere A, Guinet R, Gille Y. Evaluation of Five Commercial Antifungal Susceptibility Testing Systems. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12(5):336–42.
8. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC et al. Multi-center Comparison of the SensiYeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Reference Method for Testing Clinical Isolates of Common and Emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. and Other Yeasts and Yeast-Like Organisms. J Clin Microbiol 1999;37(3): 591–5.
9. Biodisk AB, Etest-Guidelines. 1997.
10. Diagnostika LD Labor, Hefe-Empfindlichkeitstestung mit der Agar-Diffusions-Methode. Gebrauchsanleitung, 1997:1–2.

11. Pfaller MA, Messer SA, Bolmström A, Odds FC, et al. Multisite Reproducibility of the Etest MIC Method for Antifungal Susceptibility Testing of Yeast Isolates. *J Clin Microbiol* 1996;34(7):1691–3.
12. Dankmeier S, Shah PM. Einfache colorimetrische Methode der Empfindlichkeitstestung von *Candida* species mit Phenolrot. *Management & Krankenhaus, Sonderbeil Labormedizin*, 05/1998.
13. Espinel-Ingroff, A., In vitro Activity of the New Triazole Voriconazole (UK-109,496) against Opportunistic Filamentous and Dimorphic Fungi and Common and Emerging Yeast Pathogens. *J Clin Microbiol* 1998;36(1):198–202.
14. Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Erwin ME, Jones RN. Interlaboratory Evaluation of Etest Method for Testing Antifungal Susceptibilities of Pathogenic Yeasts to Five Antifungal Agents by Using Casitone Agar Solidified RPMI 1640 Medium with 2% Glucose. *J Clin Microbiol* 1996;34(4):848–52.
15. Hacek DM, Noskin GA, Trakas K, Peterson LR. Initial Use of a Broth Microdilution Method Suitable for In Vitro Testing of Fungal Isolates in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol* 1995;33(7):1884–9.
16. Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, et. al. Selection of Candidate Quality Control Isolates and Tentative Quality Control Ranges for In Vitro Susceptibility Testing of Yeast Isolates by National Committee for Clinical Laboratory Standards Proposed Standard Methods. *J Clin Microbiol* 1994;32(7):1650–3.
17. Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, et. al. Quality Control Guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards Recommended Broth Macrodilution Testing of Amphotericin B, Fluconazole and Flucytosine. *J Clin Microbiol* 1995;33(5):1104–7.
18. Pfaller MA, Messer SA, Coffmann S. Comparison of Visual and Spectrophotometric Methods of MIC Endpoint Determination by Using Broth Microdilution Methods To Test Five Antifungal Agents, Including the New Triazole D0870. *J Clin Microbiol* 1995;33(5):1904–7.
19. To W-K, Fothergill AW, Rinaldi MG. Comparative Evaluation of Macrodilution and Alamar Colorimetric Microdilution Broth Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Yeast Isolates. *J Clin Microbiol* 1995;33(10):2660–4.
20. van Eldere J, Joosten L, Verhaeghe A, Surmont I. Fluconazole and Amphotericin B Antifungal Susceptibility Testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Method Compared with Etest and Semiautomated Broth Microdilution Test. *J Clin Microbiol* 1996;34(4):842–7.
21. Odds FC, Vranckx L, Woestenborghs F. Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Evaluation of Technical Variables for Test Automation. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(9):2051–60.
22. Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Martinez-Suarez JV, Sanchez R. Comparison of a Spectrophotometric Microdilution Method with RPMI-2% Glucose with National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Macrodilution Method M27-P for In Vitro Susceptibility Testing of Amphotericin B, Flucytosine and Fluconazole against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(9):1998–2003.
23. Wagner A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Method for Antifungal Susceptibility testing: Enhanced Ability To Detect Amphotericin B-Resistant *Candida* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(11):2520–2.
24. Yoshida T, Jono K, Okonogi K. Modified Agar Dilution Susceptibility Testing Method for Determining In Vitro Activities of Antifungal Agents, Including Azole Compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(6):1349–51.
25. Wenisch C, Linnau KF, Parschalk B, Zedtwitz-Liebenstein K, et. al. Rapid Susceptibility Testing of Fungi by Flow Cytometry Using Vital Staining. *J Clin Microbiol* 1997;35(1):5–10.