

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Untersuchungen zur Epidemiologie von
Candida dubliniensis unter Verwendung von
molekularen und nicht-molekularen Methoden“**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Pasligh

aus Bremen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Ruhnke

2. Prof. Dr. med. G. Haase

3. Prof. Dr. A. M. Schmidt-Westhausen

Datum der Promotion: 11.12.2008

Meinen Eltern

1 Einleitung.....	7
1.1 Candida und Candidosen.....	7
1.2 Nomenklatur bei Candida Spezies.....	8
1.3 Klinische Manifestation der oropharyngealen Candidose	9
1.3.1 Pseudomembranöse Candidose	9
1.3.2 Erythematöse Candidose	10
1.3.3 Cheilitis angularis	10
1.4 Oropharyngeale Candidosen und HIV / AIDS	11
1.5 Entdeckung von <i>C. dubliniensis</i>	12
1.6 Prävalenz und klinische Relevanz von <i>C. dubliniensis</i>	13
2 Aufgabenstellung.....	15
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Patienten.....	17
3.2 Isolate	18
3.3 Material	19
3.4 Methoden	19
3.4.1 Identifizierungstests für <i>C. dubliniensis</i>	19
3.4.1.1 Arbitrarily Primed Polymerase Kettenreaktion.....	19
3.4.1.2 Kultivierung auf CHROMagar® Candida.....	21
3.4.1.3 Kultivierung auf Reisagar	21
3.4.1.4 Kultivierung auf <i>Cryptococcus</i> -Agar nach Staib.....	22
3.4.1.5 Wachstumsverhalten bei erhöhten Temperaturen	22
3.4.1.6 Identifizierung über den Analytischen Profil Index ID 32 C	22
3.4.2 Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration	24
3.4.3 Genotypisierung von <i>C. dubliniensis</i> mit der Sonde Cd25.....	25
4 Ergebnisse.....	29
4.1 Identifizierungstests für <i>C. dubliniensis</i>	29
4.1.1 Arbitrarily Primed Polymerase Kettenreaktion	31
4.1.2 Kultivierung auf CHROMagar® Candida	33
4.1.3 Kultivierung auf Reisagar	34
4.1.4 Kultivierung auf <i>Cryptococcus</i> -Agar nach Staib.....	35
4.1.5 Wachstumsverhalten bei erhöhten Temperaturen.....	36
4.1.6 Identifizierung über den Analytischen Profil Index ID 32 C.....	36
4.1.7 Gütekriterien der Tests zur Identifizierung von <i>C. dubliniensis</i>	39

4.2 Klinische Bedeutung von <i>C. dubliniensis</i>	40
4.3 Genotypisierung von <i>C. dubliniensis</i> mit der Sonde Cd25	42
4.3.1 Genotypische Variabilität in der Gesamtheit der Klone	46
4.3.2 Longitudinalverlauf bei einzelnen Patienten	48
4.3.3 Genotypische Variabilität bei HIV-positiven im Vergleich zu HIV-negativen Patienten	54
4.3.4 Genotypische Variabilität bei Patienten mit hoher im Vergleich zu Patienten mit niedriger Viruslast.....	56
4.3.5 Genotypische Variabilität bei Patienten mit niedriger im Vergleich zu Patienten mit hoher CD4-Zahl	58
4.3.6 Genotypische Variabilität von Patienten mit im Vergleich zu Patienten ohne oropharyngeale Candidose	59
4.3.7 Genotypische Variabilität unter Resistenzentwicklung	62
5 Diskussion	66
5.1 Methoden	66
5.1.1 Identifizierungstests für <i>C. dubliniensis</i>	66
5.1.2 Genotypisierung von <i>C. dubliniensis</i>	74
5.2 Klinische Bedeutung von <i>C. dubliniensis</i>	75
5.3 Genotypisierung von <i>C. dubliniensis</i> mit der Sonde Cd25	79
5.3.1 Genotypische Variabilität in der Gesamtheit der Klone	79
5.3.2 Longitudinalverlauf bei einzelnen Patienten	82
5.3.3 Genotypische Variabilität bei HIV-positiven im Vergleich zu HIV-negativen Patienten	86
5.3.4 Genotypische Variabilität bei Patienten mit hoher im Vergleich zu Patienten mit niedriger Viruslast.....	87
5.3.5 Genotypische Variabilität bei Patienten mit niedriger im Vergleich zu Patienten mit hoher CD4-Zahl	87
5.3.6 Genotypische Variabilität von Patienten mit im Vergleich zu Patienten ohne OPC.....	88
5.3.7 Genotypische Variabilität unter Resistenzentwicklung	89
6 Zusammenfassung	92
6.1 Methoden	92
6.2 Klinische Bedeutung von <i>C. dubliniensis</i>	92
6.3 Genotypisierung von <i>C. dubliniensis</i> mit der Sonde Cd25	93

7 Literatur	95
8 Anhang	106
8.1 Geräte und Materialien.....	106
8.2 Chemikalien und Lösungen.....	108
8.3 Abkürzungsverzeichnis	112
8.4 Ergebnisse der unterschiedlichen Identifizierungsmethoden	115
8.5 Klinische Merkmale der <i>C. dubliniensis</i> -Isolate	122
9 Erklärung an Eides Statt.....	133
10 Danksagung	134

1 Einleitung

1.1 *Candida* und Candidosen

Der Genus (Gattung) *Candida* gehört zu den Hefepilzen und besteht aus etwa 200 Spezies. Ursprünglich ging man davon aus, dass diese Hefen keinen sexuellen Vermehrungszyklus hätten und sich ausschließlich durch Sprossung vermehrten. Deshalb wurden sie als „fungi imperfecti“ bezeichnet. Inzwischen weiß man, dass es sich bei einigen Spezies, wie z. B. bei *Candida krusei* (*C. krusei*) um asexuelle Formen von Hefen handelt, die die Fähigkeit haben, sich sexuell fortzupflanzen. *Candida* Spezies (*Candida Spp.*) kommen im Gewebe in drei morphologischen Formen vor: 1. als Sprosszellen, 2. als Pseudohyphen und 3. als Pseudomyzelien. Die meisten klinisch wichtigen Spezies haben die Fähigkeit Pseudomyzel zu produzieren und sind sich morphologisch sehr ähnlich (80).

Die Prävalenz von Candidosen beim Menschen ist in den letzten Jahren stetig gestiegen (24), wobei neuere Daten auf eine Stabilisierung der Prävalenz hinweisen (74). Da ein geschwächtes Immunsystem für *Candida*-Infektionen prädestiniert, sind folgende Gründe für diesen Anstieg möglich (39,71):

- 1) neue Therapiemöglichkeiten bei malignen Erkrankungen, die mit Immunsuppression einhergehen
- 2) vermehrtes Durchführen von invasiven Eingriffen
- 3) zunehmende Verbreitung von Breitbandantibiotika
- 4) HIV (human immunodeficiency virus) / AIDS (aquired immunodeficiency syndrome) Pandemie
- 5) Anstieg der Prävalenz von Diabetes mellitus Typ II
- 6) Zunahme von nosokomialen Infektionen.

Durch *Candida Spp.* (wobei *C. albicans* die häufigste pathogene Spezies darstellt) können oberflächliche Infektionen der Schleimhaut und disseminierte bzw. invasive Infektionen verursacht werden (80). Hierbei sind Schleimhaut-Infektionen eher mit Defekten der zellulären Immunität assoziiert, während disseminierte Infektionen mit Störungen bzw. Reduktion der neutrophilen Granulozyten assoziiert sind (8). Auch bei Gesunden besteht eine oro-intestinale Kolonisierung mit *C. albicans*. Durch

Rachenspülung und Kultur kann anhand der Konzentration der nachgewiesenen Sprosspilze zwischen physiologischer Kolonisierung und Infektion unterschieden werden (70).

In den letzten Jahren wurde in vielen Kliniken eine epidemiologische Verschiebung der Erregerspezies zugunsten von Non-*C. albicans* Sp., wie z. B. *C. tropicalis*, *C. glabrata* oder *C. krusei* beobachtet (39,85,117).

1.2 Nomenklatur bei *Candida* Spezies

- Blastospore:** Monozelluläre Wachstumsform, auch Hefezelle genannt; entsteht aus der Mutterzelle durch Sprossung und ist in Trauben oder Ketten an der Mutterzelle fixiert.
- Sprossung:** Asexuelle Fortpflanzung durch Abschnürung.
- Chlamydospore:** Große, dickwandige Zelle, die von *C. albicans* und *C. dubliniensis* auf nährstoffarmem Agar gebildet wird und mit einer Versorgungszelle („suspensor cell“) verwachsen ist; „schlummernde“ Wachstumsform.
- Keimschlauch:** Zylindrischer Auswuchs aus Hefezellen; Vorstufe der Hyphe; wird von *C. albicans* und *C. dubliniensis* in Humanserum gebildet.
- Hyphe:** Mikroskopisch kleiner Schlauch, der aus multiplen, durch Septen voneinander getrennten Pilzzellen besteht; entsteht als Verzweigung von bereits bestehenden Hyphen oder aus Blastosporen.
- Pseudohyphe:** Gleicht mikroskopisch echten Hyphen, besteht aber aus Ketten von verlängerten Blastosporen, die nach der Sprossung aneinander gebunden geblieben und an der Mutterzelle fixiert sind.
- (Pseudo-) Myzel:** Geflecht aus (Pseudo-) Hyphen. (80)

1.3 Klinische Manifestation der oropharyngealen Candidose

Bei der oropharyngealen Candidose (OPC) immunsupprimierter Patienten unterscheidet man klinisch zwischen folgenden drei Manifestationen: Pseudomembranöse Candidose (Mundsoor), Erythematöse Candidose und Cheilitis angularis (Perlèche, Angulus infectiosus) (24,95).

1.3.1 Pseudomembranöse Candidose

Diese Form zeichnet sich durch cremig weiße oder gelbliche Beläge auf geröteter oder auch unveränderter Mundschleimhaut aus. Die pseudomembranösen Beläge sind abwischbar und hinterlassen eine blutige Mukosa. Lokalisiert ist diese Form vor allem an Wangen- und Lippschleimhaut, Zunge und Gaumen. Eine Sonderform ist die hyperplastische Candidose, die durch schwer abwischbare Beläge (fest mit der Schleimhaut verwachsenes Myzel) charakterisiert ist. Ursache ist eine nicht behandelte pseudomembranöse Candidose.



Abbildung 1. Pseudomembranöse Candidose der linken Wangenschleimhaut (105)



Abbildung 2. Hyperplastische Candidose der Gaumenschleimhaut einschließlich der Mundwinkel (105)

1.3.2 Erythematöse Candidose

Diese Variante wurde früher als atrophische Form bezeichnet. Sie geht oft der pseudomembranösen Form voraus. Die Mukosa ist durch rote Makulae gekennzeichnet, die meist an Gaumen und Zungenrücken lokalisiert sind. Die weißen Belege fehlen. Sie stellt mit einem Anteil von 50 % die häufigste Art der OPC bei HIV-positiven Patienten dar und tritt vor allem bei Patienten auf, die prophylaktisch niedrig dosiert Fluconazol erhalten haben. Sie kann schmerzhaft sein und zu Schluck- und Geschmackstörungen sowie Zungenbrennen führen.



Abbildung 3. Erythematöse Candidose des Gaumens (105)

1.3.3 Cheilitis angularis

Die Cheilitis angularis ist eine schmerzhaft und juckende, uni- oder bilateral von den Mundwinkeln ausgehende, krustige Fissur. Häufigstes Auftreten wird bei Prothesenträgern beobachtet, weniger häufig auch bei bezahnten HIV-infizierten Patienten.



Abbildung 4. *C. albicans*-assoziierte Cheilitis angularis der Mundwinkels (105)

1.4 Oropharyngeale Candidosen und HIV / AIDS

Prägend für eine fortschreitende Infektion mit dem HI-Virus bzw. für das Krankheitsbild AIDS sind opportunistische Infektionen und Tumoren. Die Candidose, besonders die Soorösophagitis gehört neben der *Pneumocystis jiroveci* Pneumonie, dem Wasting-Syndrom und der ZNS-Toxoplasmose in Deutschland zu den häufigsten AIDS-definierenden Erkrankungen (95). Die OPC gehört definitionsgemäß nicht zu den AIDS-definierenden Erkrankungen. Der Nachweis einer Soorösophagitis bei HIV gilt als AIDS-Stadium C (CDC-Klassifikation von 1993), während die OPC häufig das erste Zeichen für eine symptomatische HIV-Infektion ist (Stadium B, CDC-Klassifikation von 1993).

Tabelle 1. CDC-Klassifikation (AIDS Surveillance Case Definition for Adolescents and Adults) von 1993 (11)

CD4-ZELLEN	KLINIK		
	A Asymptomatisch/ akute HIV-Infektion	B Symptomatisch	C AIDS- definierende Erkrankungen
1) > 500/µl (≥ 29 %)	A1	B1	C1
2) 200-499/µl (14-28 %)	A2	B2	C2
3) < 200/µl (< 14 %)	A3	B3	C3

Der Zeitpunkt des ersten Auftretens einer OPC ist einerseits von der Exposition mit pathogenen Keimen und andererseits vom Schweregrad des zellulären Immundefekts (Verminderung der CD4-positiven Lymphozyten) abhängig. Die meisten HIV-Infizierten (90 bis 95 %) leiden in ihrem Krankheitsverlauf mindestens einmal unter einer OPC. Disseminierte Infektionen mit *Candida Sp.*, wie z. B. die Fungämie sind bei AIDS-Patienten (10 %) seltener als anderen immunsupprimierten Patienten, wie z. B. bei Tumorpatienten (26 %) (46). Nach einer Studie von Wisplinghoff et al. (129) haben nosokomiale Candidämien eine Gesamtmortalität von 39 %.

Die Anzahl der CD4-positiven Lymphozyten kann als Prognosefaktor für OPC bei HIV-Infizierten verwendet werden (36,108). Als Schwellenwert für die CD4-Zellzahl, unter dem eine OPC zu erwarten ist, werden 200 Zellen/µl angenommen (56). Es wurden auch andere prädisponierende Faktoren, wie z. B. intravenöser Drogengebrauch (13), Rauchen (34,108) und die HI-Viruslast beschrieben (33,34).

Greenspan et al. (35) verglichen die CD4-Zellzahl mit der Viruslast als prognostischen Parameter für das Auftreten einer OPC und kamen zu dem Schluss, dass die Viruslast für diesen Zweck besser geeignet ist. Eine Viruslast von über 36.000 Kopien/ml ist mit einem erhöhten Risiko einer OPC assoziiert, wobei sich dieses Risiko weiter erhöht, wenn zusätzlich die CD4-Zahl unter 45/ μ l sinkt (25).

1.5 Entdeckung von *C. dubliniensis*

Anfang der 90er Jahre wurde von atypischen *C. albicans*-Isolaten berichtet (63,114). Sie hatten charakteristische phänotypische Eigenschaften von *C. albicans* (z. B. die Produktion von Keimschläuchen in Humanserum und die Ausbildung von Chlamydosporen und Hyphen auf nährstoffarmen Agars), aber sie zeigten bei 42 °C oder wärmer vermindertes oder kein Wachstum, hybridisierten kaum oder gar nicht mit der *C. albicans*-spezifischen DNS-Sonde 27A, und ihr Assimilationsindex für Kohlenhydrate war keiner Spezies eindeutig zuzuordnen (114,119). Beim Hybridisieren mit Oligonukleotiden zeigte die DNS dieser atypischen Stämme ein anderes Bandenmuster als die *C. albicans*-Kontrollstämme (114). 1995 haben Sullivan et al. (119) eine Gruppe dieser atypischen Isolate, die aus der Mundhöhle von HIV-infizierten Individuen stammten, auf ihre phäno- und genotypischen Eigenschaften untersucht. Es wurden Nukleotidsequenzanalysen bestimmter Gene durchgeführt, wobei die atypischen Isolate eine in sich homogene genetische Gruppe bildeten, die sich eindeutig von anderen *Candida Spp.* unterschied. Diese Isolate wurden als neue Spezies mit dem Namen *C. dubliniensis* zusammengefasst.

Wegen der großen phänotypischen Ähnlichkeit der beiden Spezies sind Tests, die auf genotypischen Unterschieden beruhen, die sicherste Methode für deren Unterscheidung. Die bisher am Besten etablierten molekularen Methoden sind PCR-Tests, die in der Literatur mit unterschiedlichen Primern beschrieben sind (27,53,83). Aktuell ist die Sequenzierung des *C. dubliniensis*-Genoms in Arbeit. (<http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/dubliniensis/>). Im August 2005 war das bis zu dem Zeitpunkt sequenzierte *C. dubliniensis*-Genom zu 90 % übereinstimmend mit dem *C. albicans*-Genom (118). Ein aktuellerer Vergleich zwischen beiden Genomen wurde nicht veröffentlicht.

Retrospektive Studien haben ergeben, dass *C. dubliniensis*-Isolate in der Vergangenheit häufig (bei Gesunden zu 2 % und bei HIV-Infizierten zu 17 %) fälschlicherweise als *C. albicans* identifiziert worden sind (24,82). Das erste retrospektiv gefundene *C. dubliniensis*-Isolat stammt aus einer postmortalen Lungenbiopsie aus dem Jahre 1957 (115). Ursächlich liegt den Verwechslungen die Gemeinsamkeit vieler phänotypischer Charakteristika zugrunde (115,119), obwohl phäno- und biotypische Unterschiede zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* existieren. (24,91,98). Phylogenetische Untersuchungen konnten den hohen Verwandtschaftsgrad zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* belegen. Es wurde vermutet, dass sich die beiden Spezies erst kürzlich in der Evolution voneinander getrennt haben (32,119).

Da es Unterschiede in Epidemiologie, Virulenz und Sensibilität für antimykotische Substanzen zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* gibt, ist eine Methode zur eindeutigen Identifizierung sowohl für Klinik, als auch für weitere epidemiologische Studien dringend notwendig (78).

1.6 Prävalenz und klinische Relevanz von *C. dubliniensis*

Seit der ersten Identifizierung wurden weltweit Pilz-Infektionen mit Nachweis von *C. dubliniensis* nachgewiesen (4,7,13,63,98,116). Die höchste Prävalenz von *C. dubliniensis* wurde in der Mundhöhle von HIV-infizierten Patienten beobachtet (116,119) und in der Literatur mit 17 bis 32 % angegeben (51,64). Später wurde *C. dubliniensis* auch aus Bronchiallavagen, Vaginalabstrichen, Blut und Stuhl von HIV-infizierten Patienten isoliert (66,82,115). Auch bei HIV-negativen Patienten, die gesund, postoperativ oder intensivpflichtig waren, Diabetes oder eine hämatologische Grunderkrankung hatten oder sich intravenöse Drogen applizierten, wurde *C. dubliniensis* in Blut-, Sputum-, Urin- und Stuhlkulturen, Hautbiopsien, sowie Perineal- und Vaginalabstrichen nachgewiesen (9,65,73,82,92,128). Insgesamt ist die Prävalenz von durch *C. dubliniensis* verursachten oralen oder vaginalen Infektionen bei gesunden Individuen mit 11 % wesentlich geringer als bei HIV-infizierten Individuen (71). Durch *C. dubliniensis* verursachte Candidämien (48,86,122) wurden bei Patienten mit anderen Grunderkrankungen (z. B. bei durch Chemotherapie induzierte

Neutropenien oder nach Knochenmarkstransplantationen) häufiger beschrieben als bei HIV-Patienten (16,66). 2005 wurden von Carr et al. (20) die erste von *C. dubliniensis* verursachte Endokarditis bei einem HIV-negativen Individuum mit intravenösem Drogengebrauch in der Anamnese publiziert.

Die Prävalenz der asymptomatischen *C. dubliniensis*-Kolonisierung in der Mundhöhle von gesunden Individuen beträgt etwa 3 % (24). *C. dubliniensis* ist also ein seltener Bestandteil der normalen menschlichen Mundflora, der das Potential hat, orale Candidosen als endogene Infektion zu verursachen (24,116). Aus Bronchiallavagen und Sputum wird derzeit eine zunehmende Anzahl von *C. dubliniensis*-Isolaten gewonnen (28,29,49,92), was zu der Vermutung geführt hat, dass *C. dubliniensis* unter normalen Bedingungen eher Hypopharynx und oberen Respirationstrakt kolonisiert als die Mundhöhle.

Meist wird *C. dubliniensis* in einer Mischkultur mit *C. albicans* isoliert (24,106), kommt v. a. bei AIDS-Patienten auch in Monokulturen vor (24).

1999 haben Joly et al. (44) drei verschiedene „DNS-fingerprinting-Sonden“ für *C. dubliniensis* entwickelt und charakterisiert. Eine von ihnen war die *C. dubliniensis* spezies-spezifische semi-repetitive komplexe Sonde Cd25, die eine Länge von 16.000 Basenpaaren hatte. Die beiden anderen Sonden (Cd1 und Cd24) hybridisierten ebenfalls schwach mit *C. albicans*-DNS und waren somit weniger spezifisch. Mit den in Cd25 enthaltenen DNS-Sequenzen ist die Generierung von komplexen „fingerprint-Mustern“ (Bandenmuster) aus chromosomaler DNS, die mit Restriktions-Endonukleasen verdaut wurde, möglich. Diese Eigenschaft dient sowohl der Untersuchung der Epidemiologie von *C. dubliniensis*, als auch dem weiteren Beweis, dass es sich bei *C. dubliniensis* um eine eigene Spezies handelt.

2 Aufgabenstellung

Die Ziele dieser Arbeit ließen sich in drei Schwerpunkte unterteilen:

1. Evaluierung von verschiedenen Tests zur Identifizierung von *C. dubliniensis*

Obwohl die Erstbeschreibung von *C. dubliniensis* nunmehr über 10 Jahre zurückliegt, mangelt es immer noch an einer preisgünstigen, schnellen, sicheren und in Routine-Laboratorien durchführbaren Methode, um *C. dubliniensis* eindeutig zu identifizieren und von seinem engen Verwandten *C. albicans* zu differenzieren (17,106,115). Einige ausgewählte Methoden sollen mit einer großen Probenanzahl durchgeführt und evaluiert werden (AP-PCR, Kultivierung auf CHROMagar® Candida, Reisagar und *Cryptococcus*-Agar nach Staib, sowie Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Temperaturen und Analytischer Profilindex ID 32 C).

2. Klinische Bedeutung von *C. dubliniensis*

In der Literatur gibt es widersprüchliche Darstellungen zur klinischen Relevanz von *C. dubliniensis*. Um die Pathogenität dieser Hefespezies besser zu verstehen, wird das Vorliegen bzw. das Nicht-Vorliegen einer OPC mit Nachweis von *C. dubliniensis* mit anderen Parametern (Keimzahl, Viruslast und Immunstatus bei HIV-Patienten, Behandlung mit Proteaseinhibitoren, Vorliegen von Mischkulturen) korreliert.

3. Genotypisierung von *C. dubliniensis*

Man weiß wenig über die klonalen Variationen von *C. dubliniensis* während rezidivierender Episoden von OPC oder asymptomatischer Kolonisierung im Verlauf einer HIV-Infektion bzw. AIDS-Erkrankung. Hier sollen genetische Fingerabdrücke von *C. dubliniensis*-Isolaten mit der spezies-spezifischen Sonde Cd25 erstellt werden. Die gefundenen Klone sollen in Dendrogrammen miteinander verglichen werden, um den epidemiologischen Verwandtschaftsgrad darzustellen und dann unter verschiedenen Aspekten (Gründerkrankung der Patienten, Infektion oder asymptomatische Kolonisierung, Resistenz, Immunstatus und Viruslast bei den HIV-Infizierten) betrachtet werden.

Des Weiteren sollen die „*C. dubliniensis*-fingerprints“ der einzelnen Patienten im Verlauf von mehreren Jahren beobachtet werden. Die Fragestellungen sind hierbei:

- Treten verschiedene Klone im Verlauf auf oder persistiert ein Klon?
- Unter welchen Bedingungen treten die genetischen Veränderungen auf (antiretrovirale und antimykotische Medikation, Viruslast, Immunstatus)? Welche Konsequenzen hat das für die Klinik (Resistenzentwicklung, Symptomatik)?

Es soll also insgesamt eine epidemiologische Studie von aus der Mundhöhle stammenden *C. dubliniensis*-Isolaten unter verschiedenen Aspekten durchgeführt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Die untersuchten Proben stammten größtenteils von Patienten, die sich in der HIV-Sprechstunde von Prof. Dr. med. M. Ruhnke, Klinik für Onkologie und Hämatologie der Charité Campus Mitte, Berlin vorstellten. In der HIV-Sprechstunde wurden regelmäßig Screening-Untersuchungen auf Hefepilze im Rachenspülwasser durchgeführt. Für diese Arbeit wurden retrospektiv die Patienten ausgewählt, die mindestens einmal im Verlauf mit *C. dubliniensis* in der Mundhöhle kolonisiert bzw. infiziert waren. Insgesamt wurden 30 Patienten ausgewählt (21 Männer und 9 Frauen), 26 von ihnen waren HIV-infiziert. Die vier HIV-negativen Patienten litten unter Lungentuberkulose, einem hochmalignen B-Zell-Lymphom (Zentroblastom), einer Rezidiv-cALL (Common Acute Lymphoblastic Leucemia) nach AML (Akute Myeloische Leukämie) bzw. Sichelzell- β -Thalassämie mit Zustand nach Knochenmarktransplantation.

Tabelle 2. Übersicht über die Patienten. Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis im Anhang erläutert. „OPC“ bezeichnet hier ausschließlich die pseudomembranöse Form der OPC. Die Patientenummerierung ist nicht fortlaufend, weil es sich um die Labor-interne Patientenummerierung handelt.

Patient	Geb.-Dat.	Geschlecht	Erkrankung	Anzahl der Rachenspülwasser	sonstige Proben	Zeitraum	OPC
1	16.02.66	m	HIV	23	-	04/94-09/02	nein
2	04.09.62	m	HIV	14	-	04/90-06/91	nein
3	25.06.58	m	HIV	8	-	05/94-01/95	ja
4	13.06.62	w	HIV	1	-	06/95	ja
5	08.10.68	w	HIV	1	-	04/95	nein
6	14.09.38	m	HIV	21	-	07/94-11/02	ja
7	01.09.63	m	HIV	2	-	11/95-02/96	nein
8	25.09.59	m	HIV	2	-	11/90-08/92	ja
9	16.03.40	m	HIV	6	-	08/94-11/94	ja
10	06.05.58	w	HIV	22	-	08/89-06/91	ja
11	16.12.57	w	HIV	47	-	08/93-11/02	ja
13	07.08.40	m	Tbc	1	-	10/90	nein
14	28.02.62	m	HIV	21	-	03/94-12/02	ja
15	18.04.53	m	HIV	21	-	11/93-05/95	ja
16	05.07.56	w	B-Zell-Lymphom	5	1 BAL	06/98-12/98	nein

Patient	Geb.-Dat.	Geschlecht	Erkrankung	Anzahl der Rachen-spülwasser	sonstige Proben	Zeitraum	OPC
17	10.05.60	m	HIV	7	-	02/94-12/94	ja
18	04.05.63	m	HIV	4	-	11/95-01/96	ja
19	28.02.72	w	HIV	1	-	04/95	nein
21	24.10.44	m	HIV	34	-	05/91-05/95	ja
22	05.10.67	m	HIV	20	-	04/94-10/99	ja
23	29.11.64	w	AML	1	-	08/97	nein
24	29.08.50	w	HIV	1	-	06/95	nein
25	15.02.43	m	HIV	7	-	10/94-03/95	nein
26	04.04.35	m	HIV	48	-	09/93-02/99	ja
27	07.01.41	m	HIV	28	-	12/94-10/02	nein
28	18.10.56	m	HIV	27	-	05/93-09/97	nein
29	08.10.86	w	KM-Tx	2	1 BK	01/95-07/98	nein
31	30.03.57	m	HIV	1	-	04/95	nein
33	06.07.62	m	HIV	10	-	09/95-05/97	ja
38	07.01.71	m	HIV	12	-	06/98-03/00	ja

3.2 Isolate

Die Isolation der Hefen erfolgte aus Rachenspülwasser-Proben. Insgesamt wurden 398 Rachenspülwasser-Proben untersucht, pro Patient existierten 1 bis 48 Proben. Die Proben wurden von 1989 bis 2002 gewonnen. Die einzelnen Patienten wurden über einen Zeitraum von bis zu 9 Jahren untersucht.

Vor der Probenentnahme reinigte der Patient die Mundhöhle mit Leitungswasser. Dann wurden Mundhöhle und Rachen mit 10 ml isotoner Kochsalzlösung gespült und die Spüllösung in einem sterilen und verschließbaren Gefäß aufgefangen. Je 100 µl der Spüllösung wurden auf Sabouraud-Dextrose-Agar und CHROMagar® Candida ausplattiert und über 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Falle eines Hefewachstums wurden die KBE (Kolonie bildenden Einheiten) hinsichtlich Anzahl, Farbe und Morphologie beurteilt. Bei Wachstum von unterschiedlichen *Candida Spp.* (erkennbar an der unterschiedlichen Färbung auf CHROMagar® Candida, siehe Kapitel 3.4.1.2) wurden diese getrennt und Subkulturen auf Sabouraud-Dextrose-Agar angefertigt. Die weiteren Tests wurden bei allen *Candida*-Kolonien durchgeführt, die auf CHROMagar® Candida grün gewachsen waren (*C. dubliniensis* oder *C. albicans*).

Zur Lagerung wurden fünf bis sechs Kolonien der Sabouraud-Dextrose-Kultur abgetragen, in ein Glasröhrchen mit 2 ml autoklavierter Magermilch eingerührt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.3 Material

Alle Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen, die für die Versuche benutzt wurden, sind in den Tabellen 12 und 13 im Anhang aufgelistet und werden im Text nicht noch einmal erwähnt.

3.4 Methoden

3.4.1 Identifizierungstests für *C. dubliniensis*

3.4.1.1 Arbitrarily Primed Polymerase Kettenreaktion

Isolierung von chromosomaler DNS

Vier bis fünf *Candida*-Kolonien wurden in 10 ml Sabouraud-Dextrose-Brühe suspendiert und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttelwasserbad über Nacht (üN) inkubiert. Die Zellen wurden 15 min bei 3.000 U/min (Umdrehungen/pro Minute) abzentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 1 ml Sorbitol gewaschen und in 1 ml SE-Puffer (Sorbitol-EDTA-Puffer) resuspendiert. Zum Aufspalten der Zellwände wurden 2 μl 2-Mercaptoethanol und 100 μl Zymolase zugefügt, gemischt und 40 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren (5 min bei 2.500 U/min) wurde das Pellet durch Zugabe von 1 ml SE-Puffer gewaschen. Der durch Zentrifugieren (5 min bei 2.500 U/min) entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,5 ml NaCl-EDTA resuspendiert. Es wurden 30 μl Proteinase K, 100 μl SDS (10 %) und nach vorsichtigem Mischen 100 μl RNase zugefügt und 30 min bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Das Zellpellet wurde abzentrifugiert (1 min bei 2.500 U/min) und die im Überstand enthaltende DNS wurde 2- bis 3-mal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1) extrahiert. Hierbei wurde ein äquivalentes Volumen PCI zu der Probe

gegeben und für 2 min geschwenkt. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 13.000 U/min wurde die entstandene obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Vorgang wurde 2- bis 3-mal wiederholt. Das restliche Phenol wurde durch einen Waschschrift mit Chlorform/Isoamylalkohol (Cl, 24:1) entfernt. Auch hier wurde ein äquivalentes Volumen Cl hinzu gegeben, 2 min geschwenkt und 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand mit der chromosomalen DNS wurde durch Zugabe des gleichen Volumens eiskalten Isopropanols und Inkubation bei -70 °C für 20 min gefällt. Das durch Zentrifugieren (15 min bei 13.000 U/min) entstandene Pellet wurde in Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 µl TAE gelöst (18). Die Konzentrationsbestimmung der DNS erfolgte durch eine photometrische Messung in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm). Als Referenz diente eine Messung gegen Aqua destillata als Leerwert.

AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction)

Bei dieser Abwandlung der PCR wird nur ein Primer verwendet. Der verwendete Primer RP02 hat die Sequenz 5' gCg ATC CCC A 3' und wurde das erste Mal von Akopyanz et al. (1) verwendet. Sullivan et al. führten 1995 die erste AP-PCR mit diesem Primer bei *C. dubliniensis* durch (119).

Die zu amplifizierenden Proben wurden auf eine DNS-Konzentration von 10 ng/µl verdünnt. Der Master-Mix für 20 Ansätze (19 Proben und eine Negativkontrolle) wurde auf Eis folgendermaßen angesetzt:

745 µl	Aqua dest.
100 µl	10 x Reaktionspuffer
40 µl	Magnesiumchlorid
80 µl	dNTP-Reaktionsgemisch
20 µl	Primer RP02
5 µl	Taq-Polymerase

Je 48 µl Master-Mix wurden in autoklavierte 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und je 10 µl (entsprechend 100 ng Proben-DNS) hinzugefügt. Um eine Evaporation des Reaktionsgemisches zu verhindern, wurde ein Tropfen Mineralöl dazu gegeben.

Im Thermocycler lagen folgende Reaktionsbedingungen vor:

Schritt 1:	94 °C	5 Minuten	
Schritt 2:	36 °C	5 Minuten	
Schritt 3:	72 °C	5 Minuten	
Schritt 1 bis 3 wurde 4-mal wiederholt			
Schritt 4:	94 °C	1 Minute	(Denaturierung)
Schritt 5:	36 °C	1 Minute	(Primeranlagerung)
Schritt 6:	72 °C	2 Minuten	(Strangverlängerung)
Schritt 4 bis 6 wurde 30-mal wiederholt			
Schritt 7:	72 °C	10 Minuten	
Schritt 8:	4 °C	zeitlich unbegrenzt	

Die Gesamtdauer der AP-PCR betrug ca. 6 Stunden (119,125).

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,2 %-iges Agarose-Gel (1,2 g Agarose mit 100 ml TBE und 2 µl Ethidiumbromid) verwendet. Je 7 µl PCR-Produkt wurden mit 3 µl Gelladepuffer in die Taschen des Gels pipettiert. Als Marker dienten 250 ng des Molekulargewichtsmarkers VI ® (Fa. Roche), dessen Fragmentbereich zwischen 0,15 und 2,1 kbp (Kilo-Basenpaaren) liegt. Die Elektrophorese lief über 2 Stunden bei 75 Volt. Das fertige Gel wurde unter UV-Licht digital fotografiert.

3.4.1.2 Kultivierung auf CHROMagar® Candida

Aus dem Rachenspülwasser wurde wie oben erwähnt eine Primärkultur auf CHROMagar® Candida (81) erstellt. Unter Inkubation bei 37 °C für 48 Stunden entwickelte sich eine Farbexprimierung, die ermöglichte, die verschiedenen *Candida*-Spezies voneinander zu unterscheiden.

3.4.1.3 Kultivierung auf Reisagar

Eine *Candida*-Kolonie wurde auf Reisagar ausgeimpft. Ein steriles Deckglas wurde aufgelegt, und die Kultur wurde 24 bis 72 Stunden bei Raumtemperatur bebrütet. Alle 24 Stunden erfolgte unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung eine Beurteilung auf die Art der Pseudomyzel- und Chlamydosporenbildung.

3.4.1.4 Kultivierung auf *Cryptococcus*-Agar nach Staib

Eine Hefekolonie wurde auf Staibagar übergeimpft und bei 30 °C für 48 Stunden inkubiert und dann am Mikroskop unter 100-facher Vergrößerung auf Myzel- und Chlamydosporenbildung beurteilt.

3.4.1.5 Wachstumsverhalten bei erhöhten Temperaturen

Zwei *Candida*-Kolonien wurden je auf einer Sabouraud-Dextrose-Agarplatte ausplattiert, wovon eine bei 42 °C und die andere bei 45 °C inkubiert wurden. Nach 24 und 48 Stunden wurde das Wachstumsverhalten beurteilt.

3.4.1.6 Identifizierung über den Analytischen Profil Index ID 32 C

Eine frische KBE wurde in ein Plastikröhrchen mit 2 ml 0,9 % NaCl gegeben. Die Zellzahl der Hefeaufschwemmung wurde photometrisch dem Trübungsstandard McFarland 2 angeglichen, dessen optische Dichte einer Sprosspilz-Zellzahl von 2×10^7 entspricht. Von der Suspension wurden 250 µl in die im Kit enthaltene Ampulle mit C-Medium gegeben und gemischt. Je 135 µl dieses Ansatzes wurden in die Vertiefungen des API®-Teststreifens gefüllt. Der Streifen wurde verschlossen, bei 29 °C für 48 bis 72 Stunden inkubiert und dann abgelesen. Eine Vertiefung, in der eine stärkere Trübung als in der Negativkontrolle vorlag, zeigte eine positive Reaktion an.

Der ID 32 C ist ein kommerzieller Assimilationstest für Kohlenhydrate. Er dient der Überprüfung der Fähigkeit von Hefen, in einem definierten Minimalmedium zu wachsen. Dieses Minimalmedium enthält außer definierten Kohlenhydraten alle notwendigen Wachstumsbausteine, die von Hefen verstoffwechselt werden können (Angabe der Firma bioMérieux).

Tabelle 3. Bezeichnung der Tests von ID 32 C

0.0	SOR	D-Sorbit	1.0	GAL	D-Galaktose
0.1	XYL	D-Xylose	1.1	ACT	Aktidion (Cycloheximid)
0.2	RIB	D-Ribose	1.2	SAC	D-Saccharose
0.3	GLY	Glycerol	1.3	NAG	N-Acetyl-Glukosamin
0.4	RHA	L-Rhamnose	1.4	LAT	Laktat
0.5	PLE	Palatinose	1.5	ARA	L-Arabinose
0.6	ERY	Erythrit	1.6	CEL	D-Cellobiose
0.7	MEL	D-Melibiose	1.7	RAF	D-Raffinose
0.8	GRT	Natrium-Glukuronat	1.8	MAL	D-Maltose
0.9	MLZ	D-Melezitose	1.9	TRE	D-Trehalose
0.A	GNT	Kalium-Glukonat	1.A	2KG	Kalium 2-Keto-Glukonat
0.B	LVT	Levulinat	1.B	MDG	Methyl- α D-Glukopyranosid
0.C	GLU	D-Glukose	1.C	MAN	D-Mannit
0.D	SBE	L-Sorbose	1.D	LAC	D-Lactose
0.E	GLN	Glukosamin	1.E	INO	Inosit
0.F	ESC	Äskulin Eisenziträt	1.F	0	Kontrolle

Die Assimilationsreaktionen sind in 3er-Gruppen eingeteilt. Den positiven Reaktionen werden innerhalb einer 3er-Gruppe die Zahlenwerte 1, 2 und 4 zugeordnet. Die Summen dieser Zahlenwerte innerhalb einer Gruppe ergeben einen zehnstelligen Zahlencode, der typisch für eine bestimmte *Candida Sp.* ist.

Zur Auswertung wurden die Reaktionen ins apiweb® eingegeben, und von der herstellereigenen Software wird die zugehörige Spezies ermittelt und angezeigt.

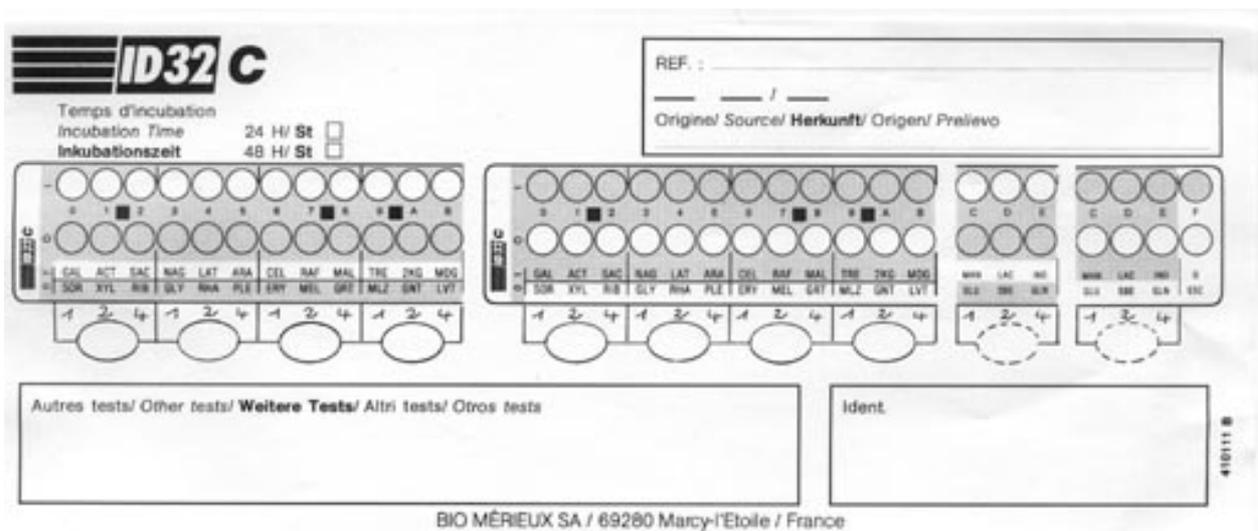


Abbildung 5. Beispiel eines ID 32 C Ergebnisblattes

3.4.2 Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration

Die MHK wurde nach der DIN-Norm 58940-84 von Oktober 2002 bestimmt (26). Zuerst wurden Fluconazol- und Itraconazol Stocklösungen in einer Konzentration von 1.280 µg/ml hergestellt. Zur Herstellung der Antimykotika-Verdünnungsreihen wurden je 100 µl modifiziertes HR-Medium in eine sterile Mikrotiterplatte gegeben. Die Stocklösung wurde mit dem Medium auf eine Konzentration von 256 µg/ml vorverdünnt und in die erste Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben. Aus der ersten Vertiefung wurden 100 µl entnommen und in die nächste Vertiefung gegeben. Das wurde fortgeführt, so dass eine logarhythmische Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 64 bis 0,125 µg/ml entstand. Das Inokulum wurde hergestellt, indem eine Pilzkolonie in 2 ml isotone Kochsalzlösung suspendiert wurde. Die Zellzahlen wurden mit Hilfe des McFarland-Standards 0,5 (entsprechend einer Sprosspilz-Zellzahl von 3×10^6) photometrisch angeglichen. Die Suspension wurde 1:1.000 mit modifiziertem HR-Medium verdünnt, und von der Verdünnung wurden je 100 µl in die Vertiefungen der vorbereiteten Mikrotiterplatte gegeben. Somit ergab sich eine Endkonzentration des Inokulums von 0,5 bis $2,5 \times 10^3$ KBE/ml. Es wurde eine Negativkontrolle (200 µl modifiziertes HR-Medium) und eine Positivkontrolle (100 µl modifiziertes HR-Medium + 100 µl Inokulum) mitgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden bei 36 °C bebrütet und nach 24 und 48 Stunden abgelesen. Als minimale Hemmstoffkonzentration galt die erste Verdünnung, in der eine deutliche Reduktion der Trübung gegenüber der Positivkontrolle sichtbar war. Zur Qualitätskontrolle wurde ein Kontrollstamm mitgeführt. Die MHK-Sollwertbereiche für den Kontrollstamm ATCC 90028 (*C. albicans*) sind für Fluconazol 1,0 bis 4,0 µg/ml und für Itraconazol 0,06 bis < 8,0 µg/ml. Die MHK-Werte wurden nach den Richtlinien der NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) interpretiert (77). Die Bezeichnung des Instituts lautet inzwischen CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute®). MHK-Werte, die zwischen den Kategorien lagen, wurden der nächst höheren Kategorie zugeordnet.

Tabelle 4. MHK-Richtlinien der NCCLS

Antimykotikum	empfindlich (S)	dosisabhängig empfindlich (S-DD)	resistent (R)
Fluconazol	≤ 8 µg/ml	16-32 µg/ml	≥ 64 µg/ml
Itraconazol	≤ 0,125 µg/ml	0,25-0,5 µg/ml	≥ 1 µg/ml

3.4.3 Genotypisierung von *C. dubliniensis* mit der Sonde Cd25

Herstellung der spezies-spezifischen Sonde Cd25

Die Arbeitsgruppe um S. Joly vom Department of Biological Sciences der University of Iowa, USA stellte uns die Cd25-Sonde (44) zur Verfügung, die in einen Lambda-Bakteriophagen kloniert worden war. Nachdem Versuche zur Präparation der Sonden-DNS in unserem Labor nicht zum Erfolg führten, erhielten wir von G. Moran (Arbeitsgruppe Coleman, School of Dental Science, Department of Oral Medicine and Pathology, University of Dublin, Irland) ein Aliquot der Phagensuspension (Titer: 2×10^9 Pfu (Plaque forming units)/ml) und den Wirtstamm *E. coli* LE 392. Diese Zellen wurden benutzt, um weitere Lysate herzustellen, von denen eines letztendlich zur Herstellung der Sonden-DNS (101) benutzt wurde.

Für die Lysat-Herstellung wurde NZCYM-Nährlösung mit 1,5 %-iger Agarose versetzt und autoklaviert. Die Agarplatten wurden mit *E. coli* LE 392 beimpft und bei 37 °C üN inkubiert. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde eine Kolonie von der Platte in 3 ml NZCYM-Medium überimpft. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) betrug nach 220 min ca. 0,7, was $0,7 \times 10^9$ Bakterien pro ml entsprach. Davon wurden 2 ml ($1,4 \times 10^9$ Bakterien) mit 250 µl eines Phagenlysats (Titer: $2,2 \times 10^9$ Pfu/ml) versetzt und für 30 min bei 37 °C im Thermoblock inkubiert. Diese Suspension wurde in 200 ml auf 37 °C vorgewärmtes NZCYM-Medium überführt und im Schüttler bei 240 U/min und 39 °C kultiviert. Nach 8 Stunden war die Zellkultur deutlich aufgeklart als Hinweis für eine gute Lyse. Nach Zusatz von 2 ml Chloroform Inkubation für weitere 10 min bei 37 °C wurde der Phagentiter bestimmt.

Bei der Titerbestimmung dienten 1,5 %-ige NZCYM-Agar-Platten als Basis Agar. Als Top Agar wurde 0,7 %-iger NZCYM-Agar verwendet, der auf 47 °C vorgewärmt war. Die Phagensuspension wurde mit SM-Medium von 10^{-2} bis 10^{-5} verdünnt. 50 µl jeder Verdünnung wurden mit je 100 µl der Bakterien-Suspension gemischt, 10 min bei 37 °C inkubiert und in den auf 47 °C vorgewärmten, flüssigen Top Agar gegeben. Dieser wurde auf den Basis Agar gegossen und üN bei 37 °C inkubiert. Die Plaques wurden ausgezählt, wobei jeder Plaque einem Bakteriophagen entsprach. Damit entsprachen 100 Plaques auf einer Platte mit 50 µl Phagenlysate bei einer Verdünnung von 10^4 einem Phagentiter von 2×10^7 Pfu/ml.

Zur Fällung der Bakteriophagen wurden 150 ml Lysat nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit jeweils 150 µg RNase und DNase versetzt (Endkonzentration: 1

µg/ml) und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 8,76 g NaCl dazugegeben (Endkonzentration: 1M), durch Schütteln gelöst und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach 12-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 8.000 U/min wurden 15 g PEG 8.000 dazugegeben (10 % (w/v)), auf dem Magnetprüher gelöst und anschließend auf Eis für 1 Stunde inkubiert. Die nächste Zentrifugation erfolgte bei 4 °C und 8.300 U/min für 16 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 8,5 ml NZCYM gelöst (Endvolumen: 10 ml).

Die Aufarbeitung des Phagenlysats erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Promega-Kit® entsprechend der Angaben des Herstellers.

DNS-Verdau

Der Verdau der chromosomalen DNS (Extraktionsprotokoll siehe Kapitel 3.4.1.1) erfolgte mit der Restriktions-Endonuklease EcoR I. Der Ansatz für einen Verdau in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß setzte sich wie folgt zusammen:

10 µg	DNS
5 µl	10 x Restriktionspuffer React 3
1,5 µl	EcoR I (15 Einheiten)
ad 45 µl	Aqua dest.

Der Reaktion lief über ca. 14 Stunden bei 37 °C.

Gelelektrophorese

Es wurde ein 0,8 %-iges Agarose-Gel (2,4 g Agarose, 300 ml 1 x TAE, 2 µl Ethidiumbromid) mit 2-mal 24 Taschen verwendet. Der Verdau wurde mit 5 µl Gelladepuffer in die Taschen pipettiert. Als Marker an beiden Seiten und zwischen den Proben der verschiedenen Patienten wurden 5 ng Lambda-Hind-III-DNS verwendet. Der Fragmentbereich des Markers lag zwischen 23.130 und 564 bp. Die Elektrophorese lief über 18 Stunden bei 30 Volt.

Southern Blot

Das Gel wurde zur Vorbereitung auf dem Horizontalschüttler für 1 Stunde in Denaturierungslösung und dann für 15 min in Transferlösung gebadet. Währenddessen wurde die Nylon-Membran mindestens 20 min in Aqua dest. gebadet. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut:

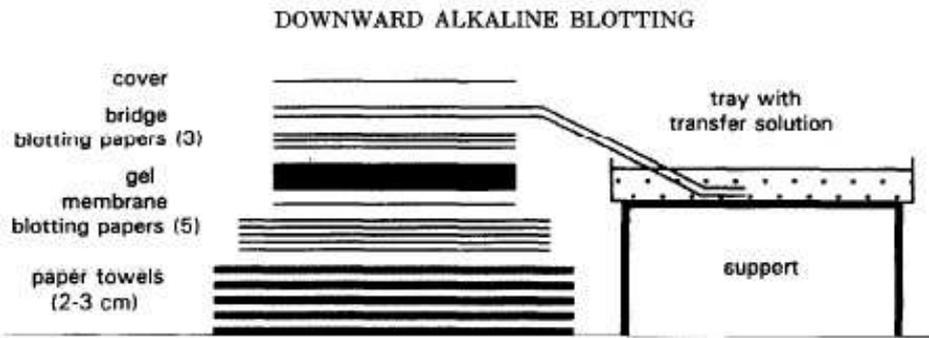


Abbildung 6. Blotaufbau nach Chomczynski 1992 (22)

Die DNS wurde innerhalb von 1 Stunde von dem Gel auf die Membran transferiert. Zur Neutralisierung wurde die Membran 10 min in Phosphatpuffer getaucht (0,5 ml/cm² Membran). Anschließend wurde die DNS durch 30-minütiges Backen bei 80 °C auf der Membran fixiert (22,112).

Radioaktive Markierung und Radiographie

Die Markierung der Sonde erfolgte mit dem kommerziellen Megaprime®-Kit und dem hochenergetischen Radioisotop ³²P (spezifische Aktivität 3.000 Ci/mmol). Von der Cd25-DNS wurden 25 ng/µl entsprechend des Protokolls des Herstellers markiert.

Zur Hybridisierung wurden 20 ml Hybridisierungspuffer im Hybridisierungsofen auf 65 °C erwärmt. Diesem wurde 200 µg denaturierte Lachssperma-DNS hinzugefügt, so dass eine Endkonzentration von 0,01 µg DNS/µl Puffer erreicht wurde. Vorher wurde die Lachssperma-DNS ebenfalls durch 5-minütige Erhitzung im kochenden Wasserbad und anschließende Abkühlung auf Eis denaturiert. Die Blots wurden in dem vorgewärmten Hybridisierungspuffer für 15 min prähybridisiert. Dann wurde die markierte Sonde in den Hybridisierungspuffer gegeben, und es wurde für 2 Stunden bei 65 °C hybridisiert. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer durch 50 ml Waschpuffer I pro Blot ersetzt. Auf dem Taumelrollmischer wurde bei Raumtemperatur für 20 min gewaschen. Dann wurden zwei weitere Waschschrte mit je 50 ml vorgewärmten Waschpuffer II bei 65 °C durchgeführt.

Die Signaldetektion erfolgte über Autoradiographie. Die Blots wurden in Klarsichtfolie gewickelt und in der Dunkelkammer ein Röntgen-Film auf die DNS-Seite des Blots gelegt. Je nach Grad der Radioaktivität des dTTPs wurde über eine bzw. mehrere Nächte in einer Röntgenkassette exponiert. Der belichtete Film wurde in einem vollautomatischen Entwicklungsapparat entwickelt.

Bildbearbeitung und Erstellung der Dendrogramme

Die entwickelten Filme wurden eingescannt, mit Adobe Photoshop® auf eine Bildgröße von etwa 750 x 300 Pixel verkleinert und in das Programm Gelscan® V5.1 der Firma BioSciTec, Frankfurt/Main eingelesen. Die Banden, die durch die Software nicht automatisch erkannt wurden, mussten nachträglich manuell eingefügt werden. Für die Auswertung wurde der Bereich einbezogen, der den Lambda-Hind-III Markerbanden zwischen 23.100 bp und 2.000 bp entsprach. Den sechs Markerbanden (23.130 bp, 9.416 bp, 6.557 bp, 4.361 bp, 2.222 bp, 2.027 bp) ordnete die Software Relativwerte von 100 bis 600 zu. Jeder Proben-Bande wurde dementsprechend eine relative Größe von 100 bis 600 zugeordnet. Lambda-Hind-III hybridisierte ebenfalls mit der Sonde Cd25 und wurde somit auf den Röntgen-Filmen sichtbar, weil Cd25 auch Lambda-Sequenzen enthält.

Mit dem gleichen Programm wurden Clusteranalysen nach der Distanzfunktion „euclidean“ und der Clustermethode „average-linkage“ durchgeführt. Das Programm berechnete hierbei Distanzmaße oder Similaritätskoeffizienten zwischen den zu untersuchenden Isolaten. Aus diesen Distanzmaßen erstellt es Dendrogramme (Baumdiagramme), die eine Aussage über den Verwandtschaftsgrad unter den unterschiedlichen Isolaten ermöglichen.

Der euklidische Abstand wird nach folgender Formel berechnet:

$$d(x, y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}$$

x_1 stellt den Zahlenwert der ersten Bande von Isolat X dar und y_1 die erste Bande von Isolat Y. Der euklidische Abstand wird im Folgenden $d_{(Eu)}$ genannt.

Die Clustermethode „average linkage“ berechnet den durchschnittlichen Abstand aller Elementpaare aus den beiden Clustern.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierungstests für *C. dubliniensis*

Die *C. dubliniensis*-Stämme dieser Arbeit wurden mittels AP-PCR als solche identifiziert. Die weiteren Tests zur Identifizierung wurden zur Bestätigung bzw. Infragestellung des PCR-Ergebnisses durchgeführt. Die AP-PCR wurde hier also als molekularer Goldstandard für die Identifizierung von *C. dubliniensis* gewählt. Die kulturellen Tests sollen im folgenden Abschnitt miteinander und mit der AP-PCR als Referenz verglichen und evaluiert werden.

Tabelle 5. Unterscheidungskriterien zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* mit den in dieser Arbeit verwendeten Identifizierungsmethoden.

	Methode	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i>	Referenz
Phäno- typisch	CHROMagar® Candida	dunkelgrünes Wachstum	hellgrünes, hellblaues oder blaugrünes Wachstum	(24,90,127)
	Reisagar	viele Chlamydosporen in Duplets/Triplets am Ende von kurzen, nicht verzweigten Pseudohyphen	wenig Chlamydo- sporen, Auftreten einzeln am Ende der Pseudohyphe	(2,4,115,119)
	<i>Cryptococcus</i> - Agar nach Staib	raue Kolonien	glatte Kolonien	(2,55)
	Wachstum bei 42 °C	nein	ja	(91,119)
	Wachstum bei 45 °C	nein	ja	(91,119)
	API® ID 32 C	<i>C. dubliniensis</i> - typischer API®-Code	<i>C. albicans</i> -typischer API®-Code	(90,114,116,119)
Geno- typisch	AP-PCR mit Primer RP02 (= RAPD)	<i>C. dubliniensis</i> - typisches Bandenmuster (keine Assimilation von Trehalose, Methyl- α D- Glykosid und Xylose)	<i>C. albicans</i> -typisches Bandenmuster (keine Assimilation von Glycerol)	(114,119)
	Hybridisierung mit Cd25	starke Hybridisierung	keine Hybridisierung	(44)

Die Abweichungen der Anzahl der Proben, die in den einzelnen Tests untersucht wurden, mit der in Kapitel 4.1.1 genannten Probenanzahl ist dadurch gegeben, dass nicht in allen Fällen eine Rekultivierung der eingefrorenen, zum Teil älteren Isolate möglich war, um die noch ausstehenden Tests durchzuführen.

Als Validitätskriterien für die Tests zur Identifizierung von *C. dubliniensis* und zur Differenzierung von *C. albicans* wurden Sensitivität und Spezifität für jeden Test nach folgender 2 x 2 Kreuzklassifikation berechnet.

Tabelle 6. 2 x 2 Kreuzklassifikation für Sensitivität und Spezifität

TESTERGEBNIS	<i>C. DUBLINIENSIS</i>	<i>C. ALBICANS</i>	SUMME
Positiv	a richtig positiv	b falsch positiv	a + b
Negativ	c falsch negativ	d richtig negativ	c + d
Summe	a + c	b + c	n

Sensitivität

Fähigkeit eines diagnostischen Tests, Personen mit einer fraglichen Erkrankung vollständig herauszufiltern; definiert als das Verhältnis von Personen mit positivem Testergebnis zu den tatsächlich Kranken. Sensitivität = $a/(a+c)$ (94)

Spezifität

Fähigkeit eines diagnostischen Tests, ausschließlich Personen mit einer fraglichen Erkrankung zu erfassen; definiert als das Verhältnis der Personen mit negativem Testergebnis zu den Nicht-Kranken. Spezifität = $d/(b+d)$ (94)

Youden-Index

Maßzahl, die die Güte eines diagnostischen Tests in einem Wert zusammenfasst; Berechnung nach der Formel $Y = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$. Der Youden-Index sollte zwischen 0 und 1 liegen, wobei ein diagnostischer Test dann gut ist, wenn Y nahe 1 liegt (130).

4.1.1 Arbitrarily Primed Polymerase Kettenreaktion

Bei dieser Abwandlung der PCR ergeben sich genetische Fingerabdrücke, die ermöglichen, verschiedene Spezies voneinander zu unterscheiden.

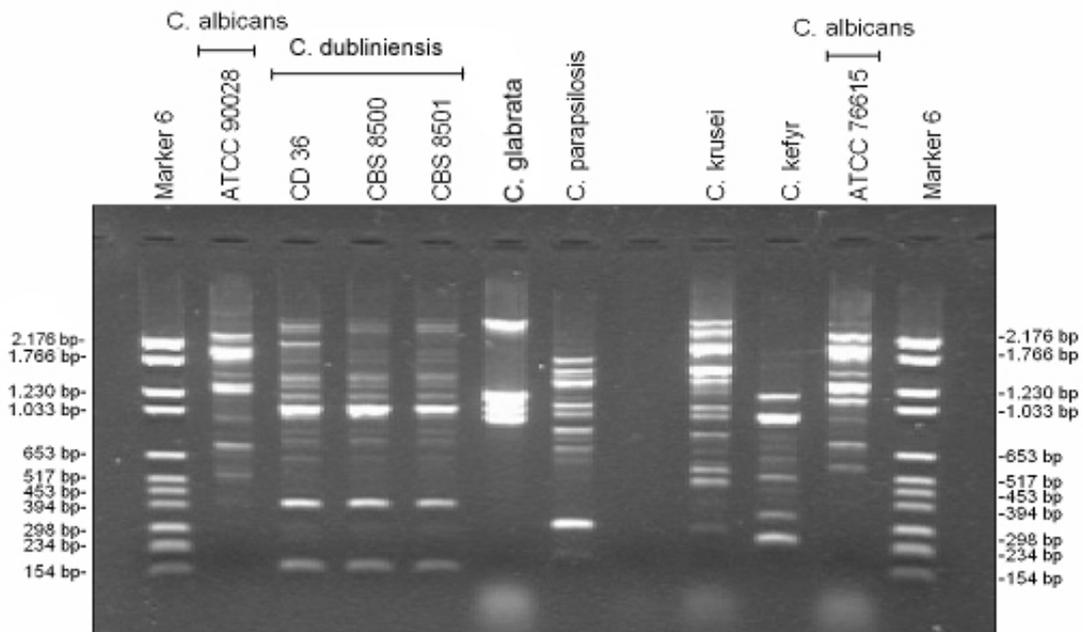


Abbildung 7. Beispiel AP-PCR mit Primer RP02 anhand von folgenden Kontroll-Stämmen

ATCC 90028:	<i>C. albicans</i> (American Type Culture Collection, Manassas, VA)
ATCC 76615:	<i>C. albicans</i> (American Type Culture Collection, Manassas, VA)
CD 36:	<i>C. dubliniensis</i> (National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF), Bristol, UK)
CBS 8500:	<i>C. dubliniensis</i> (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande)
CBS 8501:	<i>C. dubliniensis</i> (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande)

In der von mir untersuchten Patientengruppe wurden insgesamt 530 *Candida*-Isolate nachgewiesen. Mittels AP-PCR mit dem Primer RP02 wurden 217 *C. dubliniensis*-Isolate gefunden. Von fünf weiteren Isolaten konnte aufgrund fehlender Reaktivierbarkeit keine AP-PCR durchgeführt werden. Durch übereinstimmende Ergebnisse in den kulturellen Tests bei diesen fünf Isolaten kann man insgesamt von 222 *C. dubliniensis*-Isolaten ausgehen. 96 % (214/222) der gefundenen *C. dubliniensis*-Isolate stammten von HIV-infizierten Patienten, 4 % (8/222) stammten von HIV-negativen Patienten mit anderen Grunderkrankungen.

Es wurden 308 Non-*C. dubliniensis*-Isolate gefunden. Darunter waren 141 *C. albicans*, 112 *C. glabrata*, 32 *C. krusei*, 10 *C. tropicalis* und 13 andere Spezies (*S. cerevisiae*, *C. lambica*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *C. inconspicua*).

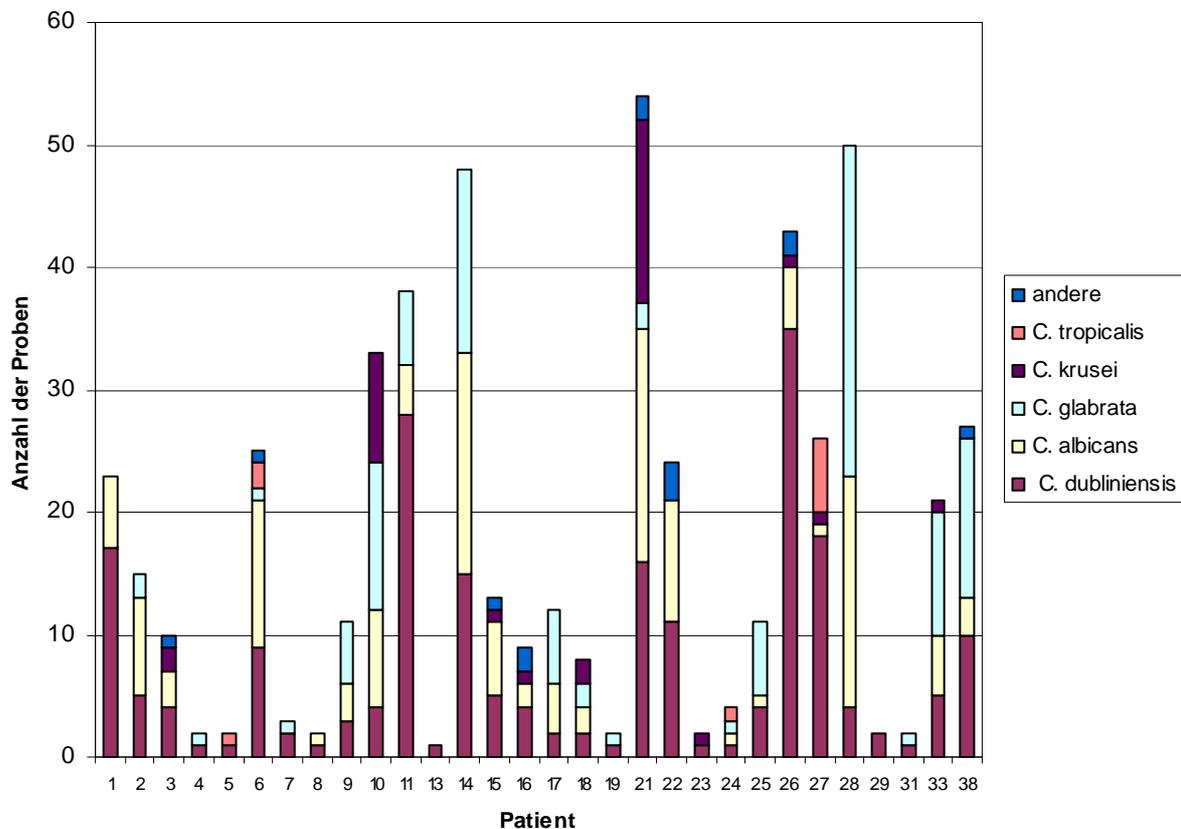


Abbildung 8. Verteilung der unterschiedlichen *Candida Sp.* in der Untersuchungsgruppe

64 % (141/222) der *C. dubliniensis*-Isolate lagen in Monokultur vor, während 37 % (81/222) in Mischkultur mit bis zu drei anderen *Candida Sp.* vorlagen. Mischkulturen von *C. dubliniensis* zusammen mit *C. glabrata* waren mit 54 % (50/93) am häufigsten. Mischkulturen zusammen mit *C. albicans* und *C. krusei* kamen zu jeweils 16 % (15/93) vor, zusammen mit *C. tropicalis* zu 7 % (6/93), mit *S. cerevisiae* zu 3 % (3/93), mit *C. lambica* zu 2 % (2/93), mit *Geotrichum candidum* und *C. inconspicua* zu jeweils 1 % (1/93) vor.

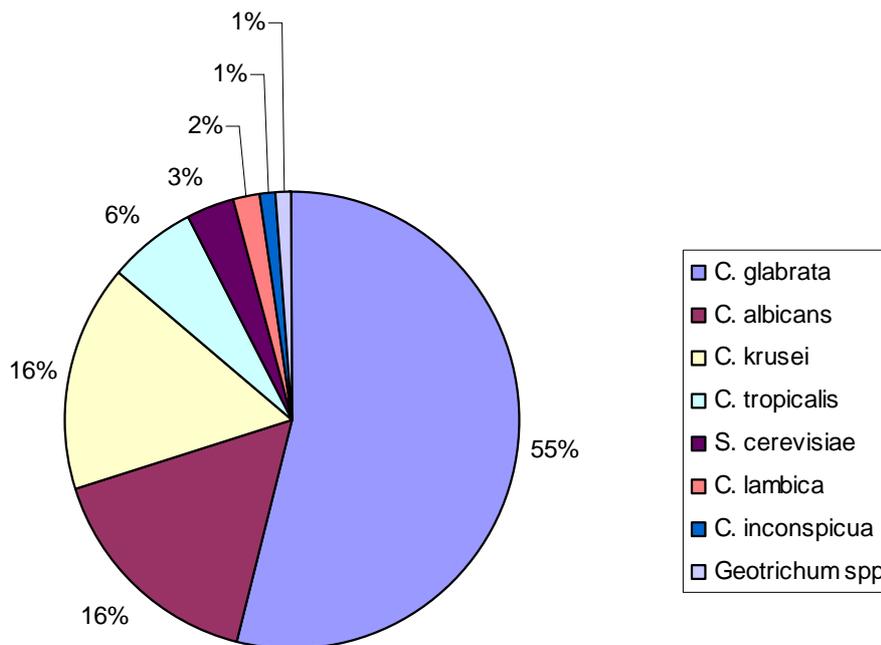


Abbildung 9. Verteilung der Mischkulturen mit *C. dubliniensis*

4.1.2 Kultivierung auf CHROMagar® Candida

Bei der Kultivierung auf CHROMagar® Candida färbt sich *C. albicans* in einem hellen blaugrün, die *C. dubliniensis*-Kolonien exprimieren eine dunkelgrüne Farbe (24,34,90,127). *C. glabrata* färbt sich lila und *C. krusei* rosé.

Insgesamt wurden 352 Isolate auf CHROMagar® Candida getestet, wovon nach AP-PCR 211 Isolate *C. dubliniensis* und 141 Isolate *C. albicans* waren. Nur 15 % (31/211) der *C. dubliniensis*-Stämme konnten auf CHROMagar® Candida aufgrund der dunkelgrünen Farbe als *C. dubliniensis* erkannt werden.

4 % (6/141) der getesteten *C. albicans*-Isolate wurden als dunkelgrün identifiziert. 96 % (135/141) der *C. albicans*-Isolate färbten sich in dem für sie eigentlich typischen hellgrün.



Abbildung 10. *C. dubliniensis* (links) und *C. albicans* (rechts) auf CHROMagar® Candida

4.1.3 Kultivierung auf Reisagar

Reisagar ist ein nährstoffarmer Agar, der sich generell zur Überprüfung der Mikromorphologie von Hefen und hefeartigen Pilzen eignet (Kulturelle Pilzdiagnostik, Fa. bioMérieux). Typisch für *C. dubliniensis* sind folgende Merkmale (2,115,119):

1. eine große Anzahl an Chlamydosporen
2. viele Verzweigungen der Pseudomyzelien
3. Chlamydosporen, die in Duplets oder Triplets angeordnet sind
4. kurze Pseudomyzelien.

C. albicans produziert auf Reisagar wenig Chlamydosporen, die meistens singulär am Ende einer Pseudohyphe auftreten.

Insgesamt wurden 341 Isolate auf Reisagar getestet, wovon laut AP-PCR 200 Isolate *C. dubliniensis* und 141 Isolate *C. albicans* waren. Alle 200 *C. dubliniensis*-Isolate bildeten Pseudomyzel und Chlamydosporen, aber nur 34 % (68/200) bildeten Merkmale aus, die eindeutig *C. dubliniensis* zuzuordnen waren. Zu diesen Merkmalen gehörten:

Unter den 68 Isolaten mit *C. dubliniensis*-typischen Merkmalen kam das Merkmal „große Anzahl an Chlamydosporen“ am häufigsten vor (bei 54 Stämmen).

5 % (7/141) der getesteten *C. albicans*-Isolate bildeten ebenfalls *C. dubliniensis*-spezifische Merkmale aus.

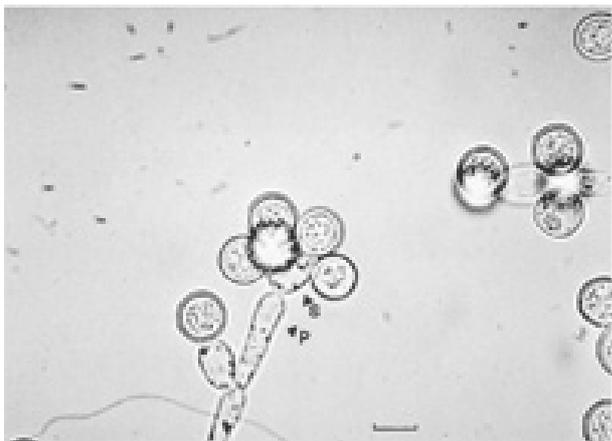


Abbildung 11. Chlamydosporen an einer einzelnen Versorgungszelle (S) am Ende eines Pseudomyzeliums von *C. dubliniensis* auf Reisagar (24)

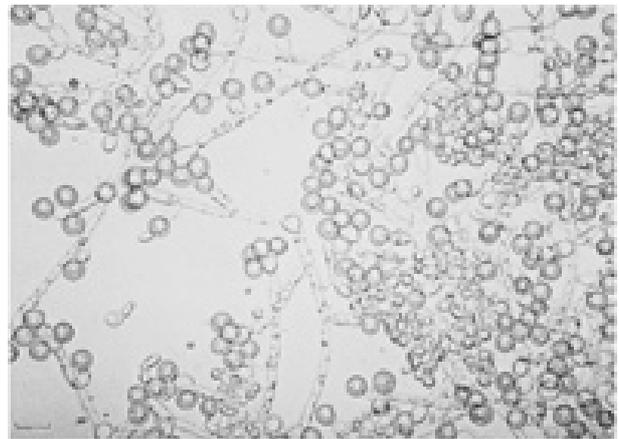


Abbildung 12. Pseudohyphen und dickwandige Chlamydosporen von *C. dubliniensis* auf Reisagar (24)

4.1.4 Kultivierung auf *Cryptococcus*-Agar nach Staib

C. dubliniensis zeichnet sich auf *Cryptococcus*-Agar nach Staib („Staibagar“) makroskopisch durch die Bildung von rauen Kolonien aus, welches durch üppiges Wachstum von Myzel mit Chlamydosporen an den Enden von Pseudohyphen bedingt ist. *C. albicans* wächst in glatten Kolonien, es werden kein Pseudomyzel und keine Chlamydosporen gebildet (2,55,113).

Insgesamt wurden 278 Isolate auf Staibagar untersucht, wovon 171 laut AP-PCR *C. dubliniensis* und 106 *C. albicans* waren. 98 % (167/171) der *C. dubliniensis*-Isolate hatten auf Staibagar ein raues Wachstum, die restlichen 2 % (4/171) hatten das für *C. albicans* typische glatte Wachstum.

97 % (103/106) der *C. albicans*-Isolate waren glatt berandet. Die restlichen 3 % (3/106) der untersuchten *C. albicans*-Isolate zeigten ein raues Wachstumsmuster.

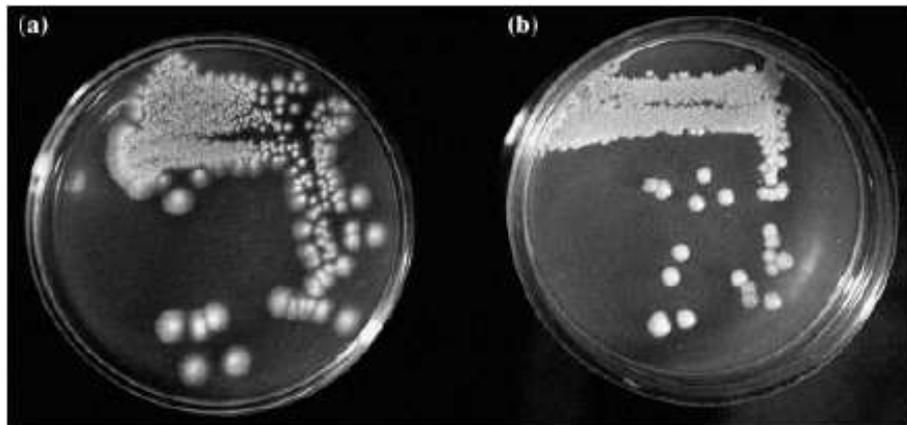


Abbildung 13. Koloniemorphologie auf Staibagar (17):
(a) rau (*C. dubliniensis*)
(b) glatt (*C. albicans*)

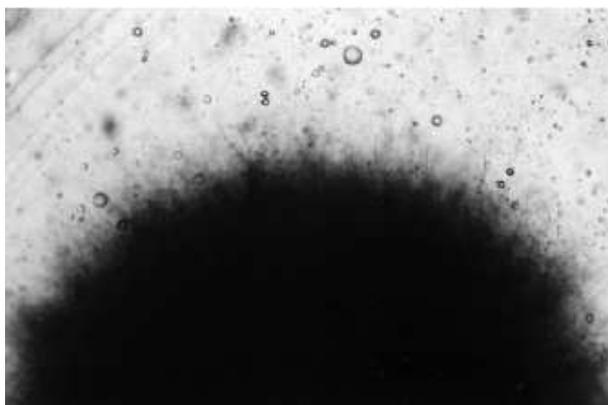


Abbildung 14. *C. dubliniensis*-Kolonie-Morphologie auf Staibagar in 100-facher Vergrößerung (17)

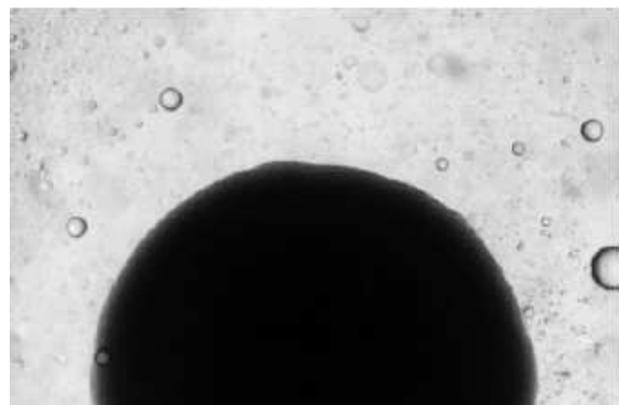


Abbildung 15. *C. albicans*-Kolonie-Morphologie auf Staibagar in 100-facher Vergrößerung (17)

4.1.5 Wachstumsverhalten bei erhöhten Temperaturen

C. dubliniensis zeigt im Gegensatz zu *C. albicans* bei 42 und 45 °C kaum bzw. gar kein Wachstum (91,119).

Es wurden 270 Isolate auf ihr Wachstumsverhalten bei 42 und 45 °C untersucht, 147 Isolate wurden in der AP-PCR als *C. dubliniensis*, 123 als *C. albicans* identifiziert. 3 % (4/147) der *C. dubliniensis*-Isolate zeigten kein Wachstum bei 42 °C, 97 % (143/147) wuchsen bei dieser Temperatur. Alle 123 *C. albicans*-Isolate wuchsen bei 42 °C.

Bei 45 °C zeigten 95 % (140/147) der *C. dubliniensis*-Isolate kein Wachstum, 5 % (7/147) wuchsen auch bei 45 °C. 2 % (2/123) der *C. albicans*-Isolate wuchsen nicht bei 45 °C, 98 % (121/123) wuchsen bei dieser Temperatur.

4.1.6 Identifizierung über den Analytischen Profil Index ID 32 C

Es wurden 350 Isolate mit dem API® ID 32 C-System untersucht. Hiervon wurden 61 % (212/350) in der PCR als *C. dubliniensis* und 39 % (138/350) als *C. albicans* identifiziert. 94 % (199/212) der als *C. dubliniensis* identifizierten Isolate hatten nach dem api-web® von 2006 einen *C. dubliniensis*-spezifischen API®-Code. Einen *C. albicans*-typischen API®-Code hatten 6 % (13/212) der *C. dubliniensis*-Isolate.

99 % (136/138) der *C. albicans*-Isolate hatten einen *C. albicans*-typischen Code. Zwei *C. albicans*-Isolate hatten einen *C. dubliniensis*-typischen Code (7142.1400.15). Beide Isolate stammten von derselben Patientin (Proben 11-19 und 11-21).

Tabelle 7. Verteilung der API®-Codes

API®-CODE	ANZAHL BEI <i>C. DUBLINIENSIS</i>	ANZAHL BEI <i>C. ALBICANS</i>	IDENTIFIZIERUNG API-WEB®
7142.1400.15	172	2	<i>C. dubliniensis</i>
7142.1000.15	24	0	<i>C. dubliniensis</i>
7143.1400.15	1	0	<i>C. dubliniensis</i>
7042.1000.15	1	0	<i>C. dubliniensis</i>
7142.1400.11	1	0	<i>C. dubliniensis</i>
7147.1400.15	2	2	<i>C. albicans</i>
7147.3400.15	9	129	<i>C. albicans</i>
7347.1400.15	1	0	<i>C. albicans</i>
7147.3500.15	1	0	<i>C. albicans</i>
7347.3400.15	0	5	<i>C. albicans</i>

Alle *C. dubliniensis*-Isolate assimilierten Galaktose, Aktidion (Cycloheximid), Maltose, Saccharose, Kalium 2-Keto-Glukonat, Sorbit, Mannit und Glukose. Keiner von ihnen konnte Arabinose, Cellobiose, Raffinose, Ribose, Rhamnose, Erythritol, Melibiose, Glukuronat, Melezitose, Kalium-Glukonat, Levulinat, Laktose, Inosit oder Sorbose assimilieren.

N-Acetyl-Glukosamin wurde zu 99,5 % von *C. dubliniensis* assimiliert, Laktat zu 0,5 %, Trehalose zu 7 %, Methyl- α D-Glykosid zu 6 %, Xylose zu 5 %, Glycerol zu 0,5 %, Palatinose zu 88 % und Glukosamin zu 99,5 %. Siehe dazu auch Tabelle 8 und 9.

Tabelle 8. Übersicht der API®-Codes der untersuchten *C. albicans*-Isolate

	7142140015	7147140015	7147340015	7347.3400.15	[%]	API®-Datenbank [%]
GAL	+	+	+	+	100	98
ACT	+	+	+	+	100	99
SAC	+	+	+	+	100	100
NAG	+	+	+	+	100	100
LAT	-	-	-	+	4	96
ARA	-	-	-	-	0	0
CEL	-	-	-	-	0	0
RAF	-	-	-	-	0	1
MAL	+	+	+	+	100	100
TRE	-	+	+	+	100	97
2KG	+	+	+	+	100	100
MDG	-	+	+	+	99	98
SOR	+	+	+	+	100	99
XYL	-	-	+	+	97	98
RIB	-	-	-	-	0	1
GLY	-	-	-	-	0	10
RHA	-	-	-	-	0	0
PLE	+	+	+	+	100	100
ERY	-	-	-	-	0	0
MEL	-	-	-	-	0	0
GRT	-	-	-	-	0	0
MLZ	-	-	-	-	0	0
GNT	-	-	-	-	0	2
LVT	-	-	-	-	0	1
MAN	+	+	+	+	100	100
LAC	-	-	-	-	0	1
INO	-	-	-	-	0	1
GLU	+	+	+	+	100	98
SBE	-	-	-	-	0	0
GLN	+	+	+	+	100	99
Anzahl	2	2	129	5	Gesamt 138	

Tabelle 9. Übersicht der API®-Codes der untersuchten *C. dubliniensis*-Isolate

	7042100015	7142100015	7142140011	7142140015	7143140015	7147140015	7147340015	7347140015	7147350015	[%]	API®-Datenbank [%]
GAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100
ACT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100
NAG	-	+	+	+	+	+	+	+	+	99,5	90
LAT	-	-	-	-	-	-	-	+	-	0,5	10
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
CEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100
TRE	-	-	-	-	+	+	+	+	+	7	0
2KG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100
MDG	-	-	-	-	-	+	+	+	+	6	0
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100
XYL	-	-	-	-	-	-	+	-	+	5	0
RIB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0,5	0
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
PLE	-	-	+	+	+	+	+	+	+	88	1
ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
GRT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
MLZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
GNT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
LVT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100
SBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
GLN	+	+	-	+	+	+	+	+	+	99,5	60
Anzahl	1	24	1	172	1	2	9	1	1	Gesamt 222	

4.1.7 Gütekriterien der Tests zur Identifizierung von *C. dubliniensis*

Der Youden-Index Y (130) wurde hier verwendet, um eine Aussage über den Zusammenhang zwischen dem positiven Testergebnis und dem tatsächlichen Vorliegen von *C. dubliniensis* zu machen. Wenn der Youden-Index nahe 1 liegt, haben sowohl Sensitivität als auch Spezifität Werte nahe 1 erreicht, was einen engen Zusammenhang zwischen einem positiven Testergebnis dem tatsächlichen Vorliegen von *C. dubliniensis* bedeutet. Der positiv prädiktive Wert wurde nicht bestimmt, weil die Prävalenz von *C. dubliniensis* in der untersuchten Population nicht repräsentativ für die Gesamtprävalenz ist. (Die Kolonisierung mit *C. dubliniensis* war ein Einschlusskriterium für diese Arbeit.) Zusätzlich wurden die Signifikanzen der Sensitivitäten mittels Chi-Quadrat-Test im Vergleich zur AP-PCR berechnet. Ein Ergebnis wurde bei $p \leq 0,001$ als signifikant gewertet.

Die Kultivierung auf Staibagar hatte eine vergleichbare Sensitivität wie die Referenz-Methode AP-PCR mit dem Primer RP02. Die Sensitivität aller anderen durchgeführten Tests war signifikant schlechter als die AP-PCR.

Tabelle 10. Beurteilung der Tests zur Differenzierung zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans*

	Sensitivität	Signifikanz (Sensitivität)	Spezifität	Youden-Index	falsch negatives Ereignis	falsch positives Ereignis
CHROMagar Candida®	15 %	$p < 0,0001$	96 %	0,14	85 %	4 %
Reisagar	34 %	$p < 0,0001$	95 %	0,32	66 %	5 %
Staibagar	98 %	$p = 0,0784$	97 %	0,95	2 %	3 %
Wachstum bei 45 °C	95 %	$p = 0,0036$	98 %	0,94	5 %	2 %
Wachstum bei 42 °C	3 %	$p < 0,0001$	100 %	0,03	97 %	0 %
API® ID 32 C	94 %	$p = 0,0006$	99 %	0,93	6 %	1 %

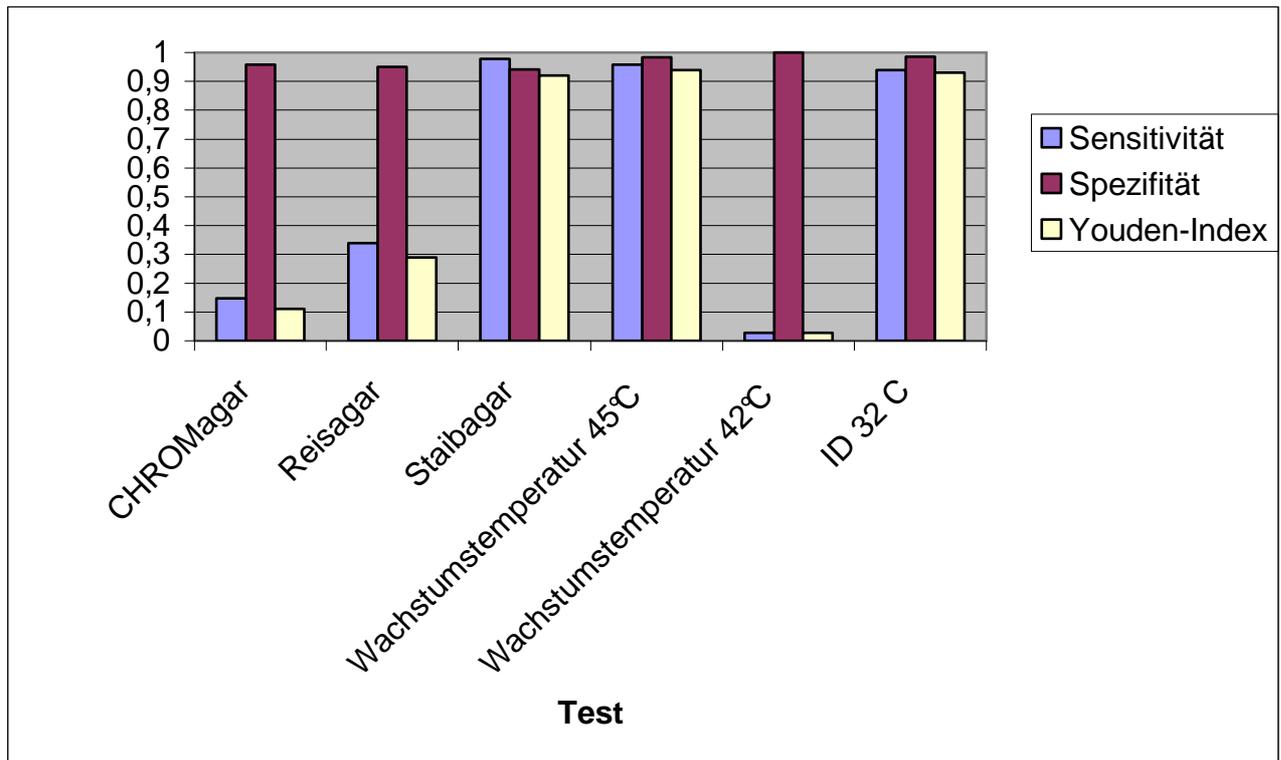


Abbildung 16. Gütekriterien der unterschiedlichen Tests

Eine Übersicht über die Ergebnisse der unterschiedlichen Identifizierungsmethoden für *C. dubliniensis* ist im Anhang Kapitel 8.4, Tabelle 14 zu finden.

4.2 Klinische Bedeutung von *C. dubliniensis*

Oropharyngeale Candidose und *C. dubliniensis*

In diesem Abschnitt soll nur die pseudomembranöse Form der OPC weiter ausgewertet werden. Andere mögliche Symptome wie Enanthem der Mundschleimhaut, Mundtrockenheit, Mundwinkelapften (Perlèche), belegte Zunge, sowie Sodbrennen, Dysphagie und retrosternale Schmerzen als möglicher Hinweis für eine Soorösophagitis sind nicht eindeutig einer *Candida*-Infektion zuzuordnen und werden hier deshalb nicht weiter berücksichtigt. 30 % (9/30) der untersuchten Patienten litten unter einer oralen pseudomembranösen Candidose (Synonym: Soor), bei der *C. dubliniensis* beteiligt war. Alle diese Patienten waren HIV-positiv.

Unabhängig von den einzelnen Patienten betrachtet trat *C. dubliniensis* in 4 % (9/208) der Fälle mit einer OPC auf. Vier dieser Isolate lagen als Monokultur und fünf als

Mischkultur vor. Vier Mischkulturen lagen zusammen mit *C. glabrata* und eine Mischkultur zusammen mit *C. krusei* vor. Eine Mischkultur von *C. dubliniensis* zusammen mit *C. albicans* kam während des Auftretens einer OPC nicht vor.

Fünf der neun *C. dubliniensis*-Isolate mit einer OPC wurden in einer Konzentration von $\geq 10^4$ KBE/ml, die übrigen vier in einer Konzentrationen von $< 10^4$ KBE/ml (dreimal 10^3 KBE/ml und einmal 10^2 KBE/ml) aus der Mundhöhle isoliert. Der Mittelwert der *C. dubliniensis*-Keimzahl, bei dem eine OPC verursacht wurde, betrug $10^4 \pm 31.88$ KBE/ml. Eine von *C. dubliniensis* verursachte OPC wurde schon bei einer Konzentration von 10^2 KBE/ml beobachtet.

Oropharyngeale Candidose mit Nachweis von *C. dubliniensis* und HI-Viruslast

Die Viruslast der Patienten, bei denen *C. dubliniensis* an einer OPC beteiligt war, betrug im Mittel $\bar{x} = 125.000$ Kopien/ml ± 102.000 . Durch *C. dubliniensis* (vorliegend in Monokultur) bedingte Soorbeläge traten in einem Fall schon bei einer Viruslast von 351 Kopien/ml auf.

Oropharyngeale Candidose mit Nachweis von *C. dubliniensis* und Immunstatus

Der Mittelwert der CD4-Lymphozyten, bei der *C. dubliniensis* an einer OPC beteiligt war, betrug $\bar{x} = 208/\mu\text{l} \pm 178$ (Normbereich: 300 bis 1.500/ μl). Die höchste Zahl an CD4-positiven Lymphozyten, bei der eine durch *C. dubliniensis* verursachte OPC vorlag, betrug 315/ μl .

Oropharyngeale Candidose mit Nachweis von *C. dubliniensis* und Behandlung mit Proteaseinhibitoren

Von den 30 hier untersuchten Patienten erhielten acht eine antiretrovirale Therapie mit Proteaseinhibitoren (PI), während 13 Patienten diese Therapie nicht erhielten. (Bei neun Patienten fehlt diese Information.)

Zwei der acht PI-Behandelten und vier der zwölf Nicht-PI-Behandelten entwickelten eine OPC. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 1$).

Auf die *C. dubliniensis*-Isolate bezogen bedeutet das, dass 3 % (2/70) der Isolate unter PI-Behandlung und 4 % (6/135) der *C. dubliniensis*-Isolate ohne PI-Behandlung eine OPC hervorriefen. Auch dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,86$).

Die klinischen Merkmale der Patienten, die während der Isolation von *C. dubliniensis* vorlagen, sind übersichtlich im Anhang in Kapitel 8.5 Tabelle 15 bis 44 dargestellt.

4.3 Genotypisierung von *C. dubliniensis* mit der Sonde Cd25

Es wurden 208 *C. dubliniensis*-Isolate von 29 Patienten mit der Sonde Cd25 untersucht. 25 dieser Patienten waren HIV-positiv, vier waren HIV-negativ. Insgesamt wurden bei diesen Patienten 58 unterschiedliche Bandenmuster entsprechend 58 unterschiedlichen Genotypen oder Klonen gefunden. Pro Patient traten maximal sieben unterschiedliche Klone auf. Bei Probe 11-4 ließ sich auch nach wiederholten Versuchen kein Bandenmuster generieren.

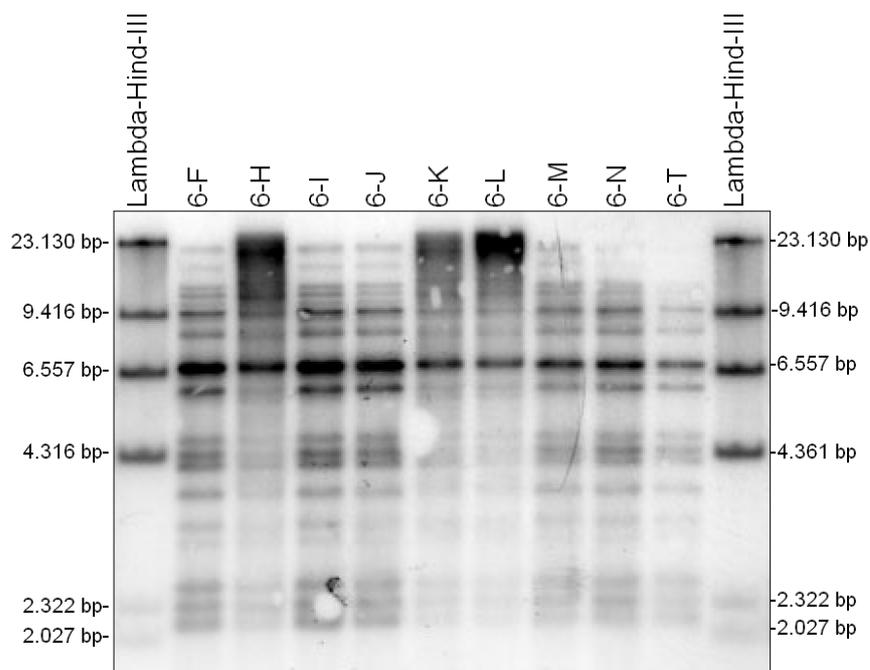


Abbildung 17. Southern Blot am Beispiel der Isolate von Patient 6. Die Sonde Cd25 enthält Lambda-Sequenzen und hybridisiert somit auch mit dem Marker Lambda-Hind-III.

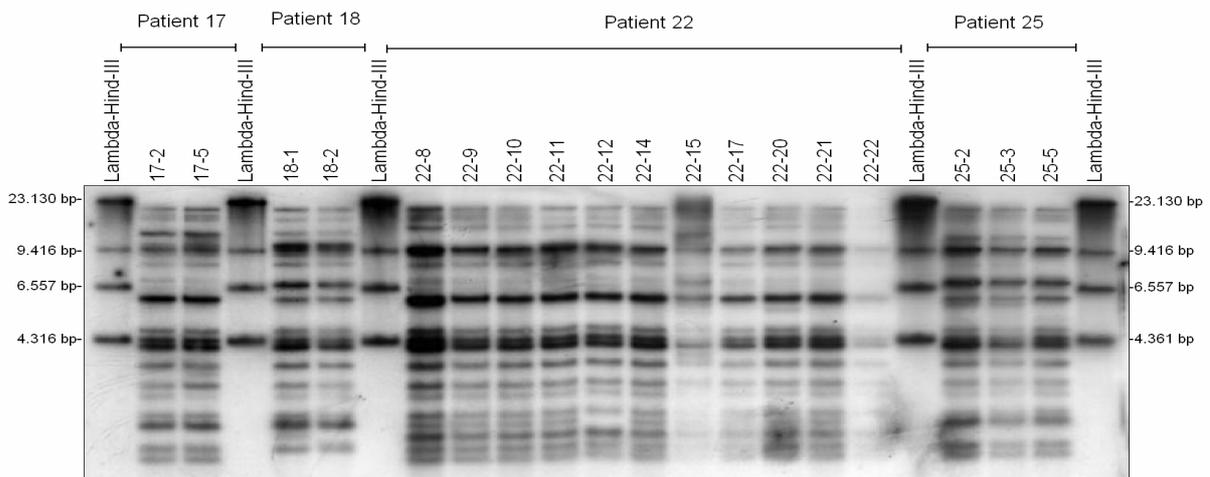


Abbildung 18. Beispiel eines Southern Blots anhand der Patienten 17, 18, 22 und 25. Die Sonde Cd25 enthält Lambda-Sequenzen und hybridisiert somit auch mit Lambda-Hind-III. Das 5. und 6. Lambda-Hind-III-Fragment ist zu schwach, um sie in dieser Auflösung zu sehen.

Die willkürliche Benennung der Klone erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde eine „Grob-Einteilung“ in neun Gruppen (Gruppe 1 bis 9) unter ausschließlicher Betrachtung des unteren Teils des Bandenmusters vorgenommen. Dann erfolgte unter Betrachtung des oberen Teils des Bandenmusters die „Fein-Einteilung“ der neun Gruppen in Untergruppen, denen Buchstaben in der Reihenfolge des Auftretens zugeordnet wurden. Es ergab sich folgende Benennung der 58 unterschiedlichen Klone:

- Gruppe 1: Klon 1a bis 1c
- Gruppe 2: Klon 2a bis 2z (2o fehlt), 2aa und 2ab
- Gruppe 3: Klon 3a und 3b
- Gruppe 4: Klon 4a bis 4c
- Gruppe 5: Klon 5a bis 5l
- Gruppe 6: Klon 6a bis 6h
- Gruppe 7: Klon 7
- Gruppe 8: Klon 8
- Gruppe 9: Klon 9

Das Distanzmaß $d_{(Eu)}$, das in der Software Gelscan® nach der euklidischen Distanzfunktion berechnet wurde und als Maß für den Verwandtschaftsgrad zwischen den unterschiedlichen Klonen dienen sollte, lag zunächst in einem Bereich zwischen 153 und 1.304, wobei $d_{(Eu)} = 0$ eine Übereinstimmung aller Banden von zwei oder mehreren unterschiedlichen Isolaten bedeutet.

In anderen epidemiologischen Studien, in denen *C. dubliniensis*-Stämme mit der Sonde Cd25 typisiert wurden (4,30,44), wurde eine andere, mir nicht zur Verfügung stehende Software benutzt (Dendron®, Fa. Solltech, Iowa). Die Clusteranalysen wurden hier mit dem Ähnlichkeitsmaß „Dice“ und der „unweighted pair-group method“ erstellt. Das Ähnlichkeitsmaß Dice wird nach der Formel: $S_{AB (Dice)} = 2E/(2E+a+b)$ berechnet, wobei E die Anzahl der gemeinsamen Banden von Isolat A und Isolat B, a die Anzahl der Banden, die individuell bei Isolat A auftreten und b die Anzahl der Banden, die individuell bei Isolat B auftreten, darstellt. Diese Formel basiert nur auf den Fragestellungen: „Ist eine bestimmte Bande in zwei zu vergleichenden Stämmen vorhanden?“ oder „Ist eine bestimmte Bande nur in einem der zu vergleichenden Stämme vorhanden?“. In die Berechnung des Distanzmaßes nach Dice werden die Übereinstimmungen von Banden ins Verhältnis zu den insgesamt bestehenden Banden unterschiedlicher Größe bei den zu vergleichenden Stämmen gesetzt. Es ergibt sich eine $S_{AB (Dice)}$ -Skala von 0 bis 1, wobei 1 eine 100 %-ige Übereinstimmung der Banden und 0 keine übereinstimmende Bande bedeutet.

Die Berechnung der Similaritätskoeffizienten nach dem Algorithmus Dice war in dem hier verwendeten Programm Gelscan® nicht möglich. Bei dem von mir verwendeten euklidischen Distanzmaß werden die Zahlenwerte, die den Banden entsprechend des Markers zugeordnet werden, qualitativ in die Berechnung mit einbezogen. Eine Vergleichbarkeit zwischen den publizierten epidemiologischen Studien von *C. dubliniensis* und meiner Arbeit war demnach nur bedingt möglich. Deshalb wurden die Zahlenwerte für die Bandenpositionen, die hier zwischen 100 und 600 lagen, mit einem mir freundlicherweise von der Firma BioSciTec zur Verfügung gestellten Zusatzmodul des Programms Gelscan® durch den Wert 1 ersetzt. Die Distanz zwischen zwei Stämmen entspricht nach euklidischer Formel dann der Wurzel aus der Anzahl der unterschiedlichen Banden [zur Erinnerung: $d(x, y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - x_2)^2}$]. Eine absolute Übereinstimmung der Banden bedeutet dann nach wie vor $d_{(Eu)} = 0$, und je höher $d_{(Eu)}$ wird, um desto mehr Banden unterscheiden sich die Klone, bzw. desto geringer ist der Verwandtschaftsgrad zwischen den Klonen (siehe Tabelle 11).

Wie oben erwähnt, geht die Gesamtzahl der unterschiedlichen Banden von zwei zu vergleichenden Stämmen in die Berechnung des Dice-Ähnlichkeitsmaßes ein. Aus diesem Grund wurde der arithmetische Mittelwert der Bandenanzahl von den 58 gefundenen Klonen ermittelt ($\bar{x} = 19,85$ Banden $\pm 1,8$). In Tabelle 11 wurden mit

diesem Wert die S_{AB} -Werte nach Dice näherungsweise umgerechnet und für lineare Funktionen interpoliert (Abb. 19). Im folgenden Text wird immer der Euklidische Abstand und in Klammern das entsprechend berechnete Ähnlichkeitsmaß nach Dice angegeben, um die Vergleichbarkeit zu bisherigen Studie herzustellen.

Tabelle 11. Umrechnung des euklidischen Distanzmaßes $d_{(Eu)}$ in das Ähnlichkeitsmaß S_{AB} nach Dice

Anzahl der unterschiedlichen Banden	$d_{(Eu)}$ (berechnet als Euklidischer Abstand)	S_{AB} (berechnet als Ähnlichkeitsmaß Dice)
0	0	1
1	1	0,95
2	1,41 ($\sqrt{2}$)	0,91
3	1,73 ($\sqrt{3}$)	0,87
4	2 ($\sqrt{4}$)	0,83
5	2,24 ($\sqrt{5}$)	0,8
6	2,45 ($\sqrt{6}$)	0,77
7	2,66 ($\sqrt{7}$)	0,74
8	2,83 ($\sqrt{8}$)	0,71

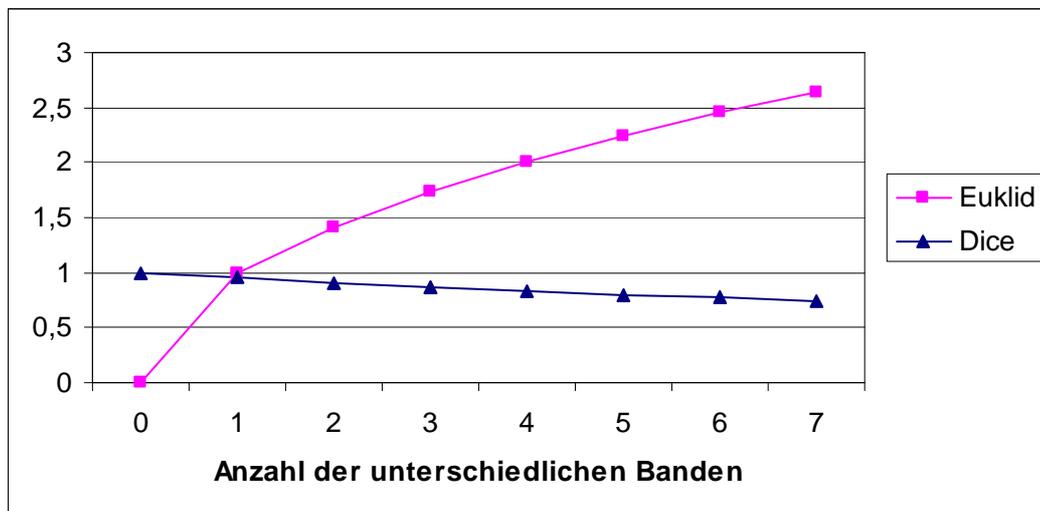


Abbildung 19. die Distanzmaße nach Euklid und Dice je nach Anzahl der unterschiedlichen Banden

In bisherigen Publikationen, in denen *Candida*-Stämme molekular typisiert und in Dendrogrammen miteinander verglichen wurden, wurde ein $S_{AB (Dice)}$ -Grenzwert von $\geq 0,8$ für „enge Verwandtschaft“ zwischen Stämmen gewählt (99,103). Von Samaranyake et al. (99) wurden die Begriffe „tight Clusters“ (eng verwandte Cluster) und „loose Clusters“ (lose verwandte Cluster) mit $S_{AB (Dice)}$ -Grenzwerten von 0,8 bzw.

0,7 eingeführt. In Anlehnung an Tabelle 11 habe ich diese Schwellenwerte bei $d_{(Eu)} = 2,24$ ($\sqrt{5}$) für eng verwandte und $2,83$ ($\sqrt{8}$) für lose verwandte Cluster gesetzt. Als Schwellenwert für sehr enge Verwandtschaft als Hinweis für stattgehabte Mikroevolution verwendete Soll (109) einen $S_{AB(Dice)}$ -Wert von 0,9. Anhand von Tabelle 11 entspricht das $d_{(Eu)} = 1,41$, was wiederum ein bis zwei unterschiedlichen Banden bei den zu vergleichenden Stämmen entspricht.

4.3.1 Genotypische Variabilität in der Gesamtheit der Klone

Die 58 unterschiedlichen Klone, die insgesamt bei den 29 untersuchten Patienten gefunden wurden, ließen sich in der Clusteranalyse bei einem Knotenpunkt von $d_{(Eu)}$ von 2,78 ($S_{AB(Dice)} = 0,72$) in zwei Hauptgruppen aufteilen (siehe Abb. 20). Zu Cd25 Gruppe I gehörten 85 % (49/58) der Klone, zu Cd25 Gruppe II gehörten 16 % (9/58) der Klone. Gruppe I ließ sich an einem Knotenpunkt von 2,64 ($S_{AB(Dice)} = 0,74$) in zwei weitere Subgruppen unterteilen. Subgruppe 1 enthielt 33 % (19/58), Subgruppe 2 enthielt 52 % (30/58) der Klone.

Die maximale Distanz unter den untersuchten Klonen betrug $1 \leq d_{(Eu)} \leq 2,78$ ($0,95 \leq S_{AB(Dice)} \leq 0,7$). Der Mittelwert ist $\bar{d}_{(Eu)} = 1,68$ mit einer Standardabweichung von $\pm 0,51$ ($S_{AB(Dice)} = 0,88$). Die Klone der Cd25 Gruppe I hatten ebenfalls eine mittlere Distanz von $\bar{d}_{(Eu)} = 1,68 \pm 0,49$ ($S_{AB(Dice)} = 0,88$) die Klone der Cd25 Gruppe II hatten eine mittlere Distanz von $\bar{d}_{(Eu)} = 1,53 \pm 0,52$ ($S_{AB(Dice)} = 0,90$). Entsprechend dem Schwellenwert von $d_{(Eu)} = 2,24$ ließen sich alle Klone in zehn eng verwandte Cluster unterteilen (I bis X). Cluster I bis III gehörten zu Cd25 Gruppe I, Subgruppe 1, Cluster IV bis XIII zu Cd25 Gruppe I, Subgruppe 2 und Cluster IX und X zu Cd25 Gruppe II.

Gruppe II enthielt die Klone 5a, 5b, 5c, 5d, 5g, 5h, 5i, 5j und 8, die bei den Patienten 7, 22 und 26 auftraten.

Bei genauer Betrachtung bestimmter Aspekte (HIV-Status, Resistenz der Isolate, Vorliegen einer OPC, Verabreichung von antimykotischer und antiretroviraler Therapie, Viruslast und Immunstatus bei HIV-Infektion) dieser drei Patienten fielen keinerlei Unterschiede zu den Patienten, von denen die *C. dubliniensis*-Klone der Gruppe I isoliert wurden, auf.

5 % (3/58) der Klone (Klon 2i, 2w und 5h) traten jeweils bei zwei unterschiedlichen Patienten auf. Klon 2i trat bei Patientin 11 und 15, Klon 2w bei Patient 14 und 25 und Klon 5h bei Patient 7 und 26 auf. Die restlichen 95 % (55/58) der Klone traten nur individuell bei einem Patienten auf.

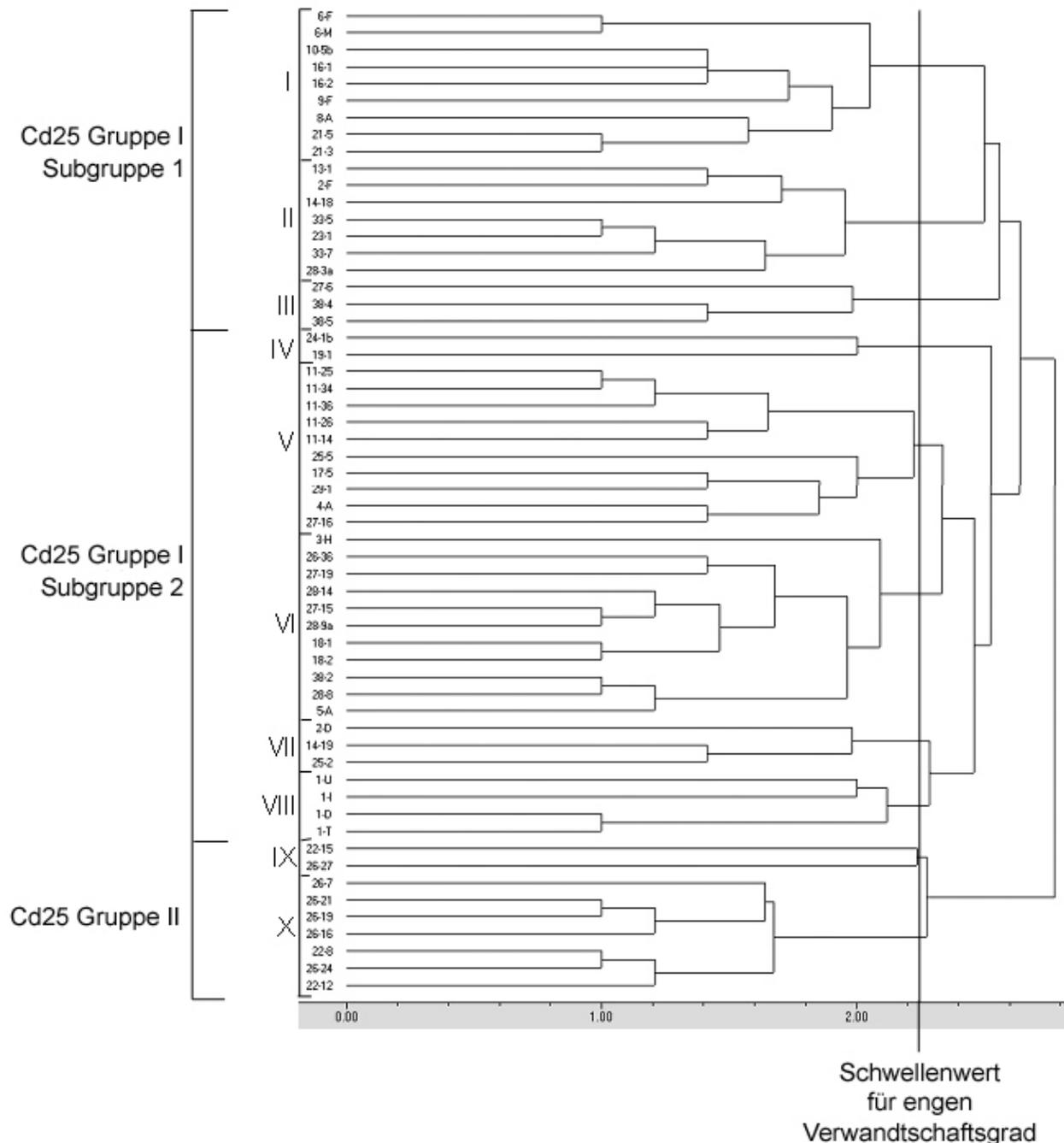


Abbildung 20. Dendrogramm von allen unterschiedlichen Klonen. Die Zahlen, mit denen das Dendrogramm beschriftet ist, sind die Proben-Nummern, die exemplarisch einen bestimmten Klon darstellen. Der erste Teil der Probennummer ist die Patientennummer (siehe auch Tabellen 15 bis 44)

4.3.2 Longitudinalverlauf bei einzelnen Patienten

Für jeden Patient wurde ein Dendrogramm aus den „fingerprints“ von dessen *C. dubliniensis*-Isolaten erstellt. Dann wurden die Patienten nach der maximalen Distanz ihrer Klone zueinander anhand der oben genannten Schwellenwerte in unterschiedliche Verwandtschaftsgrade sortiert. Die Cluster, deren Klone identisch waren, hatten ein Distanzmaß von $d_{(Eu)} = 0$. Eng verwandt waren die Cluster, deren Klone eine Distanz von $0 < d_{(Eu)} \leq 2,24$ ($\sqrt{5}$) hatten, und mäßige Verwandtschaft bestand bei $2,24 < d_{(Eu)} \leq 2,83$ ($\sqrt{8}$). Bei $d_{(Eu)} > 2,83$ bestand kein Verwandtschaftsverhältnis mehr, was bei den hier untersuchten Klonen nicht vorkam.

Bei acht Patienten existierte nur eine Probe, weshalb sie im Folgenden nicht weiter interpretiert werden. Von den übrigen Patienten waren 29 % (6/21) in aufeinander folgenden Kulturen mit dem gleichen Subtyp kolonisiert bzw. infiziert. Bei 71 % (15/21) der Patienten konnte im Verlauf mehr als ein Klon identifiziert werden. Pro Patient traten wie oben erwähnt höchstens sieben unterschiedliche Klone auf (Patient 26).

Für jedes Dendrogramm wurden die Mittelwerte des euklidischen Distanzmaßes mit entsprechender Standardabweichung ermittelt. Alle Mittelwerte lagen bei $\bar{d}_{(Eu)} \leq 1$. Die longitudinale Betrachtung der „Cd25-fingerprints“ der einzelnen Patienten erfolgte unter besonderer Berücksichtigung der Aspekte Resistenzentwicklung und klinischer Symptomatik. Im Folgenden sind Dendrogramme einiger ausgewählter Patienten dargestellt.

Identische Klone im Verlauf

Sechs Patienten (Patient 3, 7, 9, 10, 17 und 29) waren in aufeinander folgenden Kulturen mit dem gleichen Subtyp kolonisiert oder infiziert.

Patient 9

Von Patient 9, der unter einem hochmalignen B-Zell-Lymphom litt, gab es drei Isolate im Verlauf von 08/94 bis 11/94 (Probe 9-B, 9-E und 9-F), die alle Klon 4a darstellen. Es gab keine Resistenzentwicklung. Der Patient zeigte zweimalig Zeichen einer OPC. Er wurde durchgehend mit 100 mg Fluconazol/Tag behandelt.

Patientin 10

Alle vier Proben dieses Patients (10-1, 10-4, 10-5b und 10-7), isoliert zwischen 08/89 und 09/90, gehörten zu Klon 2c. Sowohl die *C. albicans*- als auch die *C. dubliniensis*-Isolate entwickelten eine simultane Resistenz gegen Itraconazol und Fluconazol. Probe 10-7 ist von allen hier untersuchten das einzige Isolat mit Fluconazol-Resistenz. Einmalig bestanden Zeichen einer OPC. Der Patient wurde intermittierend mit 100 mg Fluconazol/Tag behandelt, hat aber nie Itraconazol erhalten.

Patientin 29

Patientin 29 war ein Mädchen mit Sichelzell- β -Thalassämie, das 01/95 eine Knochenmarkstransplantation erhielt. Die Isolate (Probe 29-1 und 29-2) wurden 01/95 aus einer Blutkultur und 07/98 aus einem Rachenspülwasser isoliert und stellten Klon 2m dar. Es lagen weder Resistenz noch OPC vor. 1995 wurde sie mit 150 mg Fluconazol und 24 ml Amphotericin B/Tag behandelt.

Enger Verwandtschaftsgrad

Dieser Gruppe wurde mit 62 % (13/21) der Großteil der Patienten (Patient 1, 2, 6, 11, 14, 16, 18, 21, 25, 26, 27, 33, 38) zugeordnet. In den einzelnen Dendrogrammen gehörten alle Klone eines Patienten je einem engen Cluster an.

Patient 6 (siehe Abb. 21)

Es wurden neun *C. dubliniensis*-Isolate (Probe 6-F, 6-H, 6-I, 6-J, 6-K, 6-L, 6-M, 6-N und 6-T) von 12/94 bis 07/02 isoliert, die in zwei unterschiedlichen Klonen (Klon 3a und 3b) auftraten. Klon 3b persistierte über fünf Visiten in einem Zeitraum von sechs Jahren und zehn Monaten und war der am längsten persistierende Klon in der gesamten Untersuchungsgruppe. Er war, ebenso wie Klon 3a, immer sensibel für Fluconazol. Im Juli 2002 verursachte Klon 3b (Probe 6-T) eine OPC. Die antimykotische Therapie erfolgte über den ganzen Zeitraum entweder prophylaktisch (2 x 100 mg/Woche) oder therapeutisch (100 mg/Tag) mit Fluconazol. Der Genotyp veränderte sich unter Ausbildung einer OPC nicht, während er bei stabiler Sensibilität für Antimykotika von Klon 3a auf 3b wechselte.

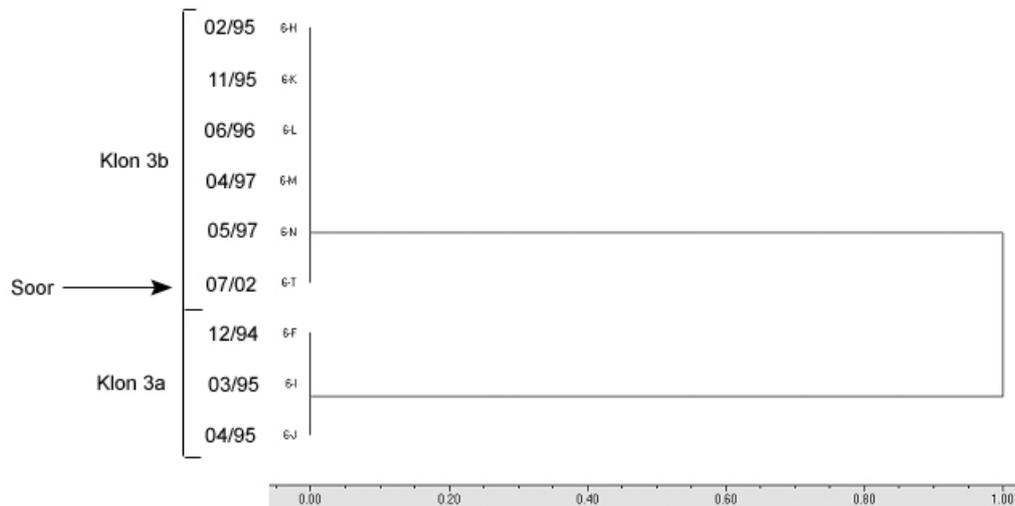


Abbildung 21. Dendrogramm von Patient 6

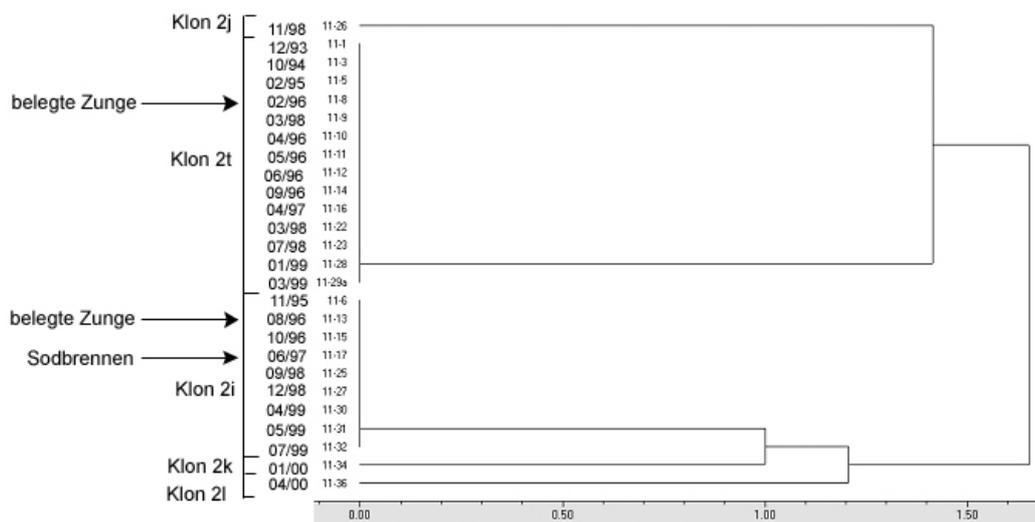


Abbildung 22. Dendrogramm von Patientin 11

Patientin 11 (siehe Abb. 22)

Bei dieser Patientin wurden 29 *C. dubliniensis*-Isolate (Probe 11-1 bis 11-17, 11-22, 11-23, 11-25 bis 11-28, 11-29a, 11-30 bis 11-32, 11-34 und 11-36) im Zeitraum zwischen 12/93 und 04/00 isoliert, die fünf unterschiedlichen Klonen (Klon 2i, 2j, 2k, 2l und 2t) zugeordnet werden konnten. Die beiden dominant vorkommenden Klone waren Klon 2i und 2t, die 9- bzw. 14-Mal vorkamen und fast abwechselnd isoliert wurden. Die anderen drei Klone kamen jeweils nur einmal vor. Zeichen einer OPC lagen zu drei Zeitpunkten vor (zweimal bei Klon 2i und einmal bei Klon 2t). In der ersten Zeit (Probe 11-1 bis

Probe 11-6) wurde antimykotisch mit Fluconazol behandelt. Der Klon wechselte also ohne Auswirkung auf Klinik oder Resistenz.

Patient 21 (siehe Abb. 23)

Die 16 Isolate (Probe 21-1 bis 21-6, 21-13, 21-15 bis 21-17, 21-20, 21-21, 21-23 bis 21-25 und 21-28) wurden von 05/91 bis 12/94 gewonnen. Sie traten in zwei unterschiedlichen Klonen auf (Klon 5e und 5f). Sowohl die *C. albicans*- als auch die *C. dubliniensis*-Isolate entwickelten eine Resistenz gegen Itraconazol bei gleich bleibenden Klon. Ab 05/94 erfolgte eine Therapie mit Fluconazol. Das Vorliegen einer OPC spiegelte sich nicht in einer Veränderung des Genotyps wider.

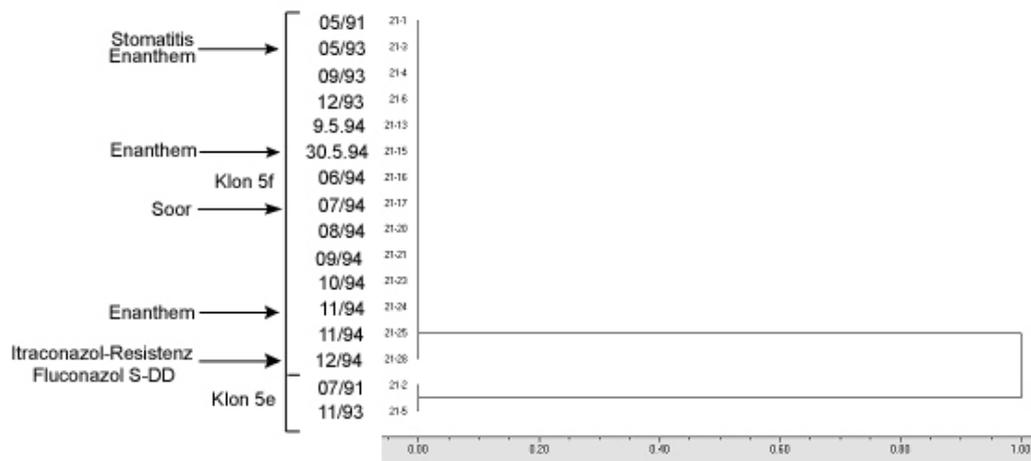


Abbildung 23. Dendrogramm von Patient 21

Patient 27 (siehe Abb. 24)

Von diesem Patient wurden 22 *C. dubliniensis*-Isolate (Probe 27-1, 27-2 und 27-4 bis 27-23) zwischen 12/94 und 10/01 isoliert, die vier unterschiedlichen Klonen entsprachen (Klon 1b, 1c, 5k und 5l). Nur Probe 27-11 war resistent gegen Itraconazol, mögliche Zeichen einer OPC (Schluckbeschwerden, Sodbrennen, retrosternale Schmerzen) traten bei den Proben 27-6, 27-10 und 27-23 auf. Über die ganze Zeit wurde keine antimykotische Therapie verabreicht. Die Änderung des Genotyps hatte also weder Auswirkung auf Symptomatik noch auf Resistenzentwicklung.

Exemplarisch wurden hier dreimal aus der Kultur einer Rachenspülwasser-Probe mehrere Kolonien entnommen und der Hybridisierung mit Cd25 zugeführt. 02/98 wurden Probe 27-11, 27-12 und 27-13 entnommen, 04/98 wurden Probe 27-14 und 27-15 und 07/98 wurden Probe 27-16 und 27-17 entnommen. Es fanden sich jeweils

unterschiedliche Klone zu einem Zeitpunkt. 02/98 waren Klon 5l, 5k und 1b, 04/98 waren Klon 1b und 1c und 07/98 waren Klon 5k und 1b nachzuweisen. Klon 5l und Klon 5k, sowie Klon 1b und Klon 1c hatten jeweils eine Distanz von $d_{(Eu)} = 1,42$ ($S_{AB (Dice)} = 0,91$) zueinander.

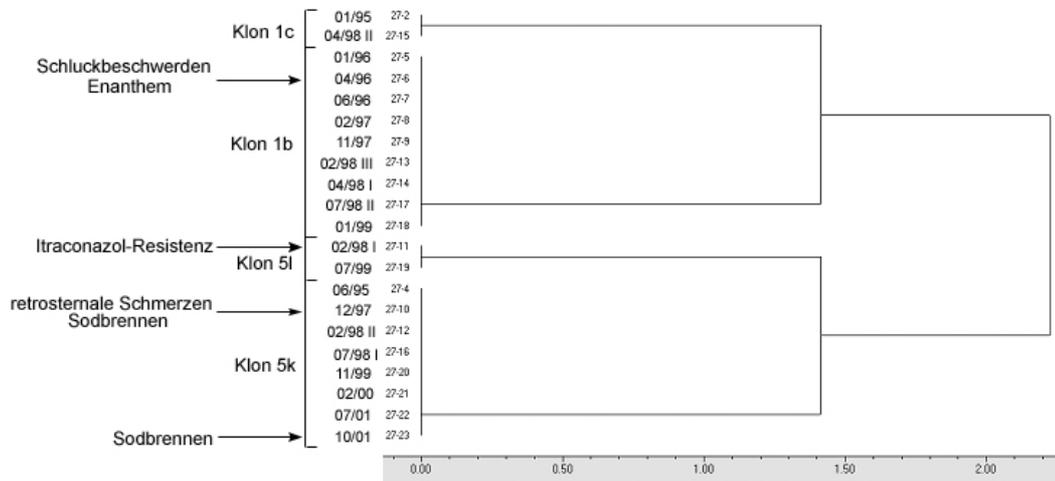


Abbildung 24. Dendrogramm von Patient 27

Patient 33 (siehe Abb. 25)

Von diesem Patient gab es fünf *C. dubliniensis*-Isolate (Probe 33-1, 33-3, 33-5, 33-7 und 33-8) aus dem Zeitraum von 09/95 bis 02/97, die zwei verschiedenen Klonen entsprachen (Klon 2n und 2y). Beim Wechsel auf Klon 2y (Probe 33-7) trat eine OPC auf. Es entwickelte sich keine Resistenz, Fluconazol wurde einmalig als Reaktion auf die OPC verabreicht.

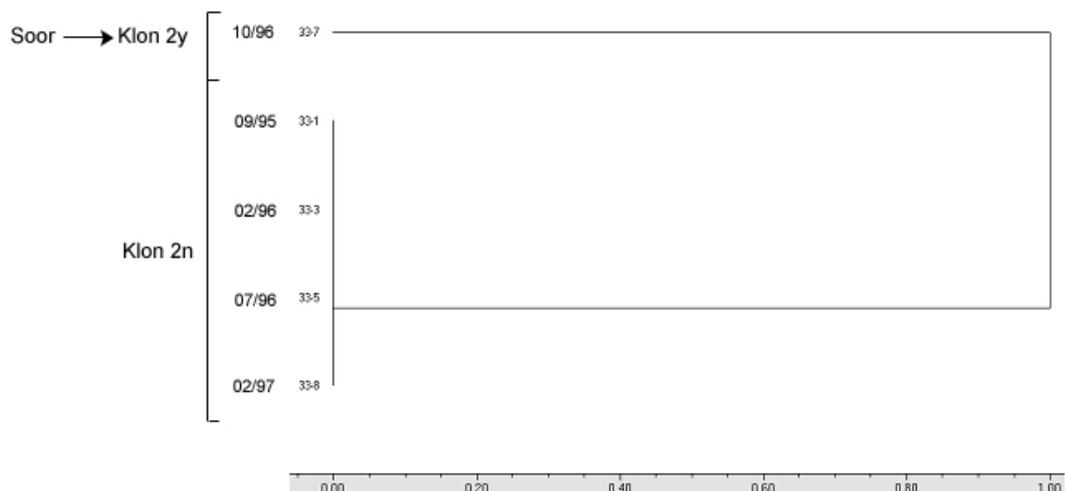


Abbildung 25. Dendrogramm von Patient 33

Patient 38 (siehe Abb. 26)

Von diesem Patient existierten zehn *C. dubliniensis*-Isolate (Probe 38-2 bis 38-5 und 38-8 bis 38-13) aus dem Zeitraum zwischen 10/98 und 03/00, die aus drei unterschiedlichen Klonen bestanden (Klon 6a, 6b und 6f). Der Wechsel von Klon 6a auf 6f und 6b ging mit Entwicklung einer Resistenz gegen Itraconazol einher. Nach dem Zurückspringen auf Klon 6a war keine Resistenz mehr vorhanden. Bei der ersten (Probe 38-2) und der letzten (Probe 38-13) Probenentnahme bestand Mundtrockenheit als mögliches Symptom einer OPC. Es erfolgte keine antimykotische Therapie.

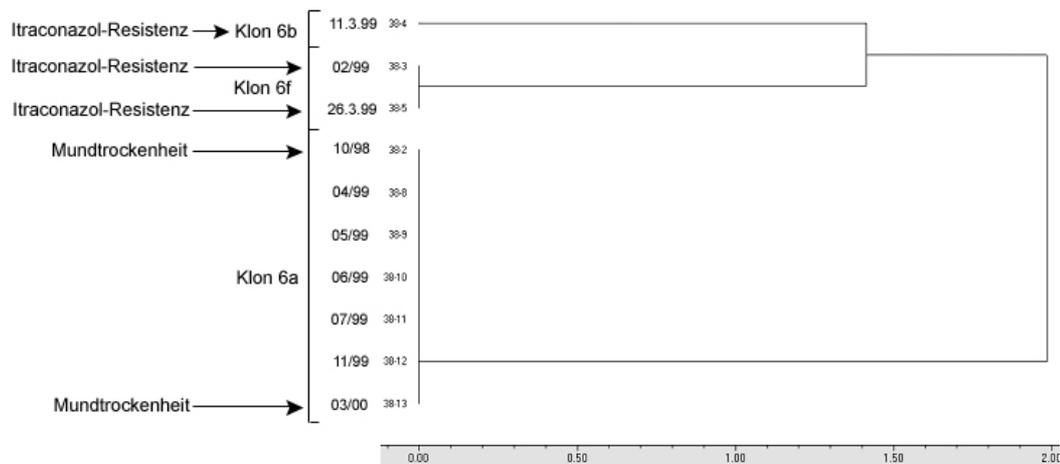


Abbildung 26. Dendrogramm von Patient 38

Mäßiger Verwandtschaftsgrad

Zu dieser Gruppe gehörten zwei Patienten (Patient 22 und 28). Hierbei ist bemerkenswert, dass Patient 28 eine homosexuelle Beziehung mit Patient 14 führte. Es konnte kein Teilen identischer Isotypen bei diesen Paar beobachtet werden. Das Dendrogramm, in dem alle bei diesen Patienten aufgetretenen unterschiedlichen Klone verglichen wurden, ergab sich eine mittlere Distanz von $\bar{d}_{(Eu)} = 1,73$ (siehe Abb. 27), was etwas über der mittleren Distanz der Gesamtheit der Klone ($\bar{d}_{(Eu)} = 1,68$) lag. Die 15 Isolate von Patient 14 (Probe 14-3, 14-10, 14-13, 14-14, 14-16 bis 14-19, 14-22, 14-24, 14-25, 14-27 bis 14-29 und 14-31) stammten aus dem Zeitraum zwischen 02/95 und 09/01, während die fünf Isolate von Patient 28 (Probe 28-3a, 28-8, 28-9a, 28-14 und 28-15) aus der Zeit von 12/93 bis 10/95 stammten. Eine zeitliche Überschneidung ergab sich nur bei den letzten drei Isolaten von Patient 28 mit dem ersten Isolat von Patient

14. In einem gemeinsamen Dendrogramm der sich zeitlich überschneidenden Klone ergab sich eine durchschnittliche Distanz von $\bar{d}_{(Eu)} = 1,43$.

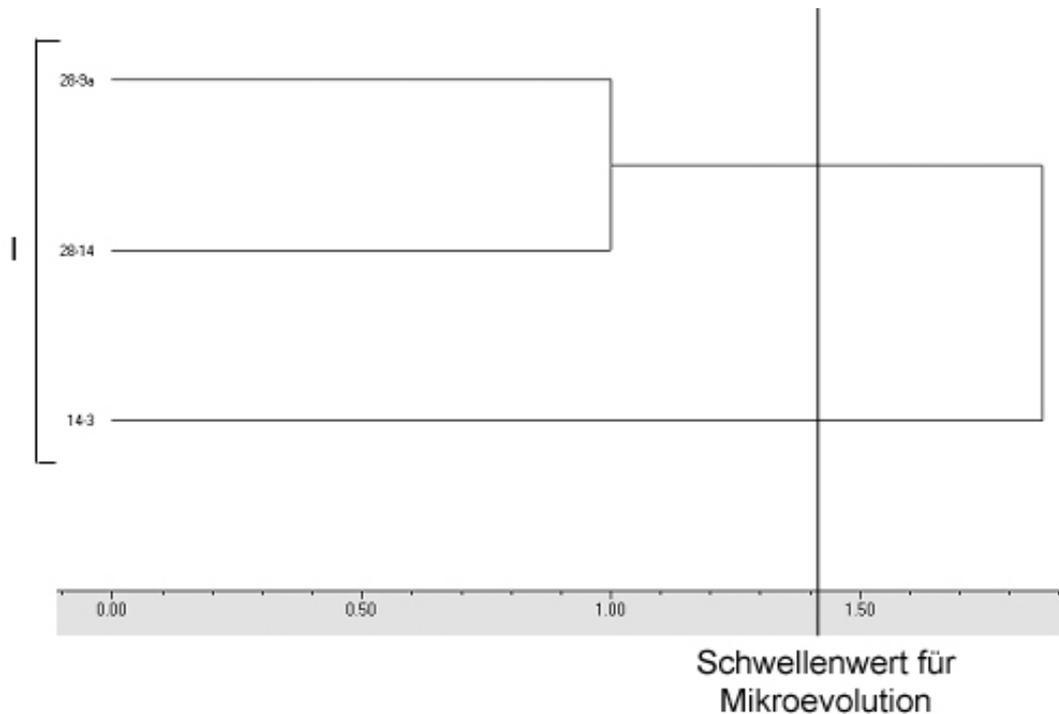


Abbildung 27. Dendrogramm der Klone von Patient 14 und 28 aus dem sich überschneidenden Zeitraum

4.3.3 Genotypische Variabilität bei HIV-positiven im Vergleich zu HIV-negativen Patienten

96 % (200/208) der mit Cd25 untersuchten *C. dubliniensis*-Isolate stammten von HIV-infizierten Patienten, die zu 53 unterschiedlichen Genotypen gehörten. Bei der Clusteranalyse der 53 Klone (siehe Abb. 28) ergab sich eine maximale Distanz von $d_{(Eu)} = 2,69$. Der Mittelwert der Distanzen betrug $\bar{d}_{(Eu)} = 1,71 \pm 0,54$ ($S_{AB(Dice)} = 0,87$). Das entspricht in etwa dem Mittelwert der Gesamtheit der Klone. Auch hier wurden zehn eng verwandte Cluster gefunden (Cluster I bis X), denen 98 % (52/53) der Klone zugeordnet werden konnten. Lose Cluster wurden nicht gebildet, weil der dazugehörige Schwellenwert von $d_{(Eu)} = 2,83$ ($S_{AB(Dice)} = 0,7$) nicht erreicht wurde. Klon 5i (Probe 22-15) ließ sich keinem engen Cluster zuordnen und kam insgesamt nur einmal vor. Klinisch ergab sich kein Hinweis auf eine besondere Eigenschaft dieses Klons (keine OPC, keine Resistenz etc.).

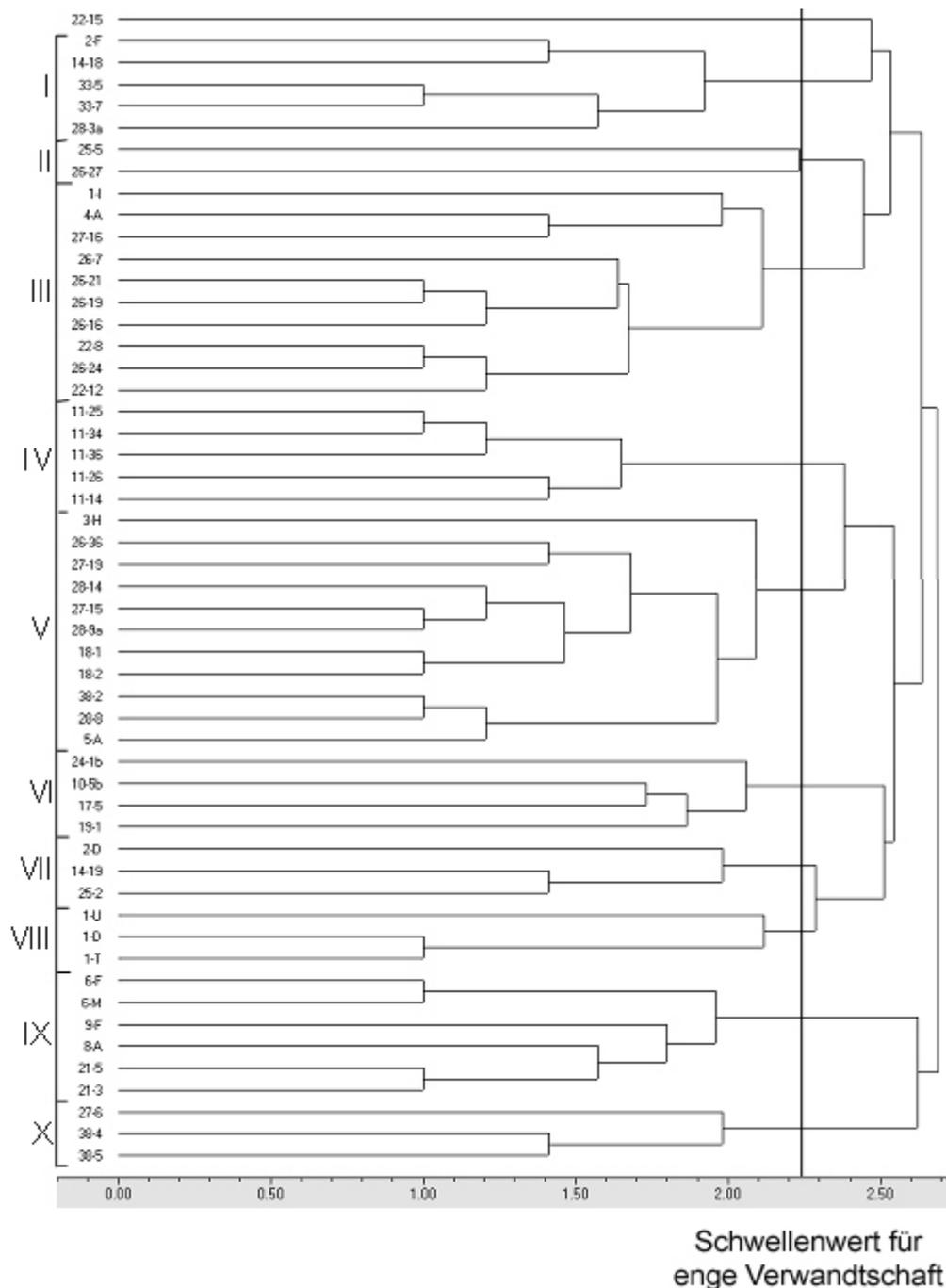


Abbildung 28. Dendrogramm der Klone der HIV-positiven Patienten

Von den vier HIV-negativen Patienten (Patient 13, 16, 23 und 29) existierten zusammen acht Isolate, unter denen es fünf unterschiedliche Klone gab. Bei der Clusteranalyse dieser Klone (siehe Abb. 29) ergab sich eine maximale Distanz von $d_{(Eu)} = 2,85$. Der Mittelwert der Distanz war $\bar{d}_{(Eu)} = 2,02 \pm 0,62$, ($S_{AB(Dice)} = 0,83$). Der Schwellenwert für lose Verwandtschaft ($d_{(Eu)} = 2,83$) wurde hier überschritten, so dass sich die Gruppe an dem Knotenpunkt von $d_{(Eu)} = 2,85$ ($S_{AB(Dice)} = 0,7$) in zwei lose Cluster aufteilte. Cluster I bestand aus vier Klonen und war ein in sich eng verwandter Cluster. Cluster II bestand

nur aus Klon 1a (Probe 13-1). Dieser Klon trat ausschließlich bei Probe 13-1 auf und war klinisch durch Resistenz gegen Itraconazol (MHK-Wert 6,25 µg/ml) auffällig.

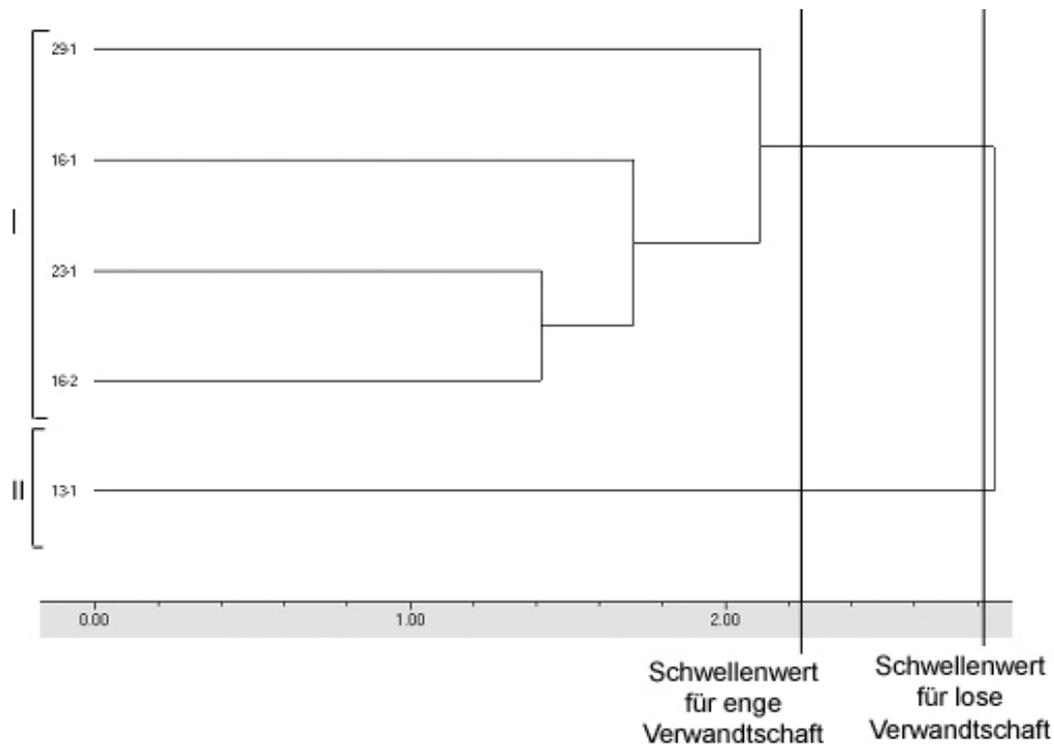


Abbildung 29. Dendrogramm der Klone der HIV-negativen Patienten

4.3.4 Genotypische Variabilität bei Patienten mit hoher im Vergleich zu Patienten mit niedriger Viruslast

Die Patienten wurden hinsichtlich der Viruslast in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bestand aus den Patienten, die im Mittel eine höhere Viruslast als 36.000 Kopien/ml hatten (Patient 6, 7, 26 und 33), die zweite Gruppe bestand aus den Patienten, die im Mittel eine niedrigere Viruslast als 36.000 Kopien/ml hatten (Patient 1, 11, 14, 22, 27, 28 und 38). Aus den Klonen beider Gruppen wurde je ein Dendrogramm erstellt und verglichen.

Der mittlere Abstand der Klone bei den Patienten mit niedriger Viruslast war $\bar{d}_{(Eu)} = 1,71 \pm 0,56$ ($S_{AB(Dice)} = 0,87$). Es stellten sich sechs eng verwandte Cluster dar (Cluster I bis VI), denen 96 % (25/26) der Klone zugeordnet werden konnten (siehe Abb. 30). Klon 5i (Probe 22-15) gehörte keinem eng verwandten Cluster an und ließ sich an einem Knotenpunkt von $d_{(Eu)} = 2,55$ ($S_{AB(Dice)} = 0,76$) von den anderen Klonen trennen. Dieser Klon stellte sich auch im Dendrogramm der Klone von den HIV-positiven

Patienten separat dar (Abb. 28). Er kam, wie erwähnt, nur einmal vor, und es ergab sich kein Hinweis auf eine besondere klinische Eigenschaft dieses Klons.

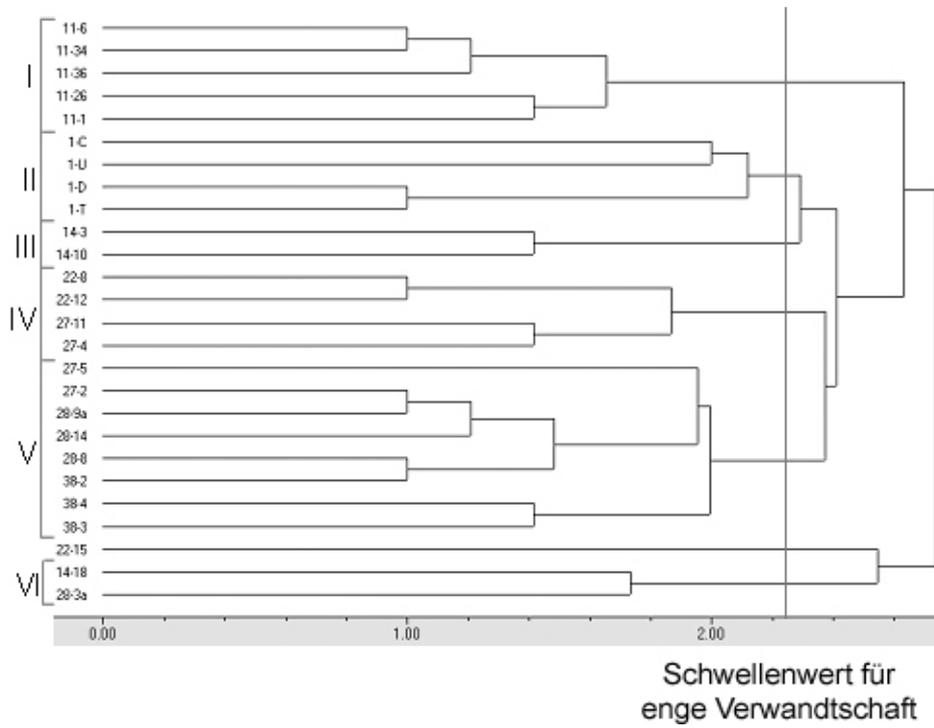


Abbildung 30. Dendrogramm der Klone, die bei einer Viruslast von < 36.000 Kopien/ml auftraten

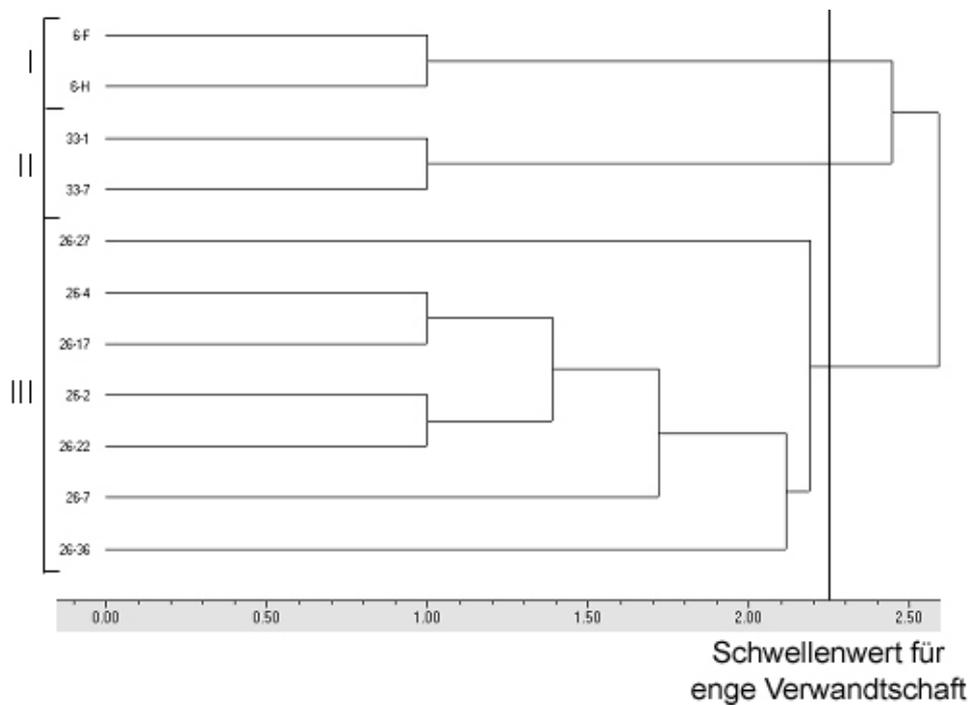


Abbildung 31. Dendrogramm der Klone, die bei einer Viruslast von > 36.000 Kopien/ml auftraten

Der mittlere Abstand der Klone bei den Patienten mit hoher Viruslast war $\bar{d}_{(Eu)} = 1,65 \pm 0,65$ ($S_{AB (Dice)} = 0,88$). Es stellten sich drei eng verwandte Cluster dar, denen alle elf Klone der Gruppe zugeordnet werden konnten (siehe Abb. 31).

4.3.5 Genotypische Variabilität bei Patienten mit niedriger im Vergleich zu Patienten mit hoher CD4-Zahl

Die Patienten wurden hinsichtlich der CD4-Zellzahl in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bestand aus den Patienten, die im Mittel eine niedrigere CD4-Zahl als $200/\mu\text{l}$ hatten (Patient 2, 3, 6, 9, 10, 15, 17, 18, 21, 22, 25 und 33), die zweite Gruppe aus den Patienten, die im Mittel eine höhere CD4-Zahl als $200/\mu\text{l}$ hatten (Patient 1, 11, 14, 26, 27, 28 und 38). Aus den Klonen jeder Gruppe wurden Dendrogramme erstellt und verglichen.

Der mittlere Abstand der Klone bei den Patienten mit niedriger CD4-Zahl war $\bar{d}_{(Eu)} = 1,8186 \pm 0,57$ ($S_{AB (Dice)} = 0,86$). Es wurden sechs eng verwandte Cluster gebildet (Cluster I bis VI), denen alle 20 Klone der Patienten mit einer CD4-Zahl von $< 200/\mu\text{l}$ zugeordnet wurden (siehe Abb. 32).

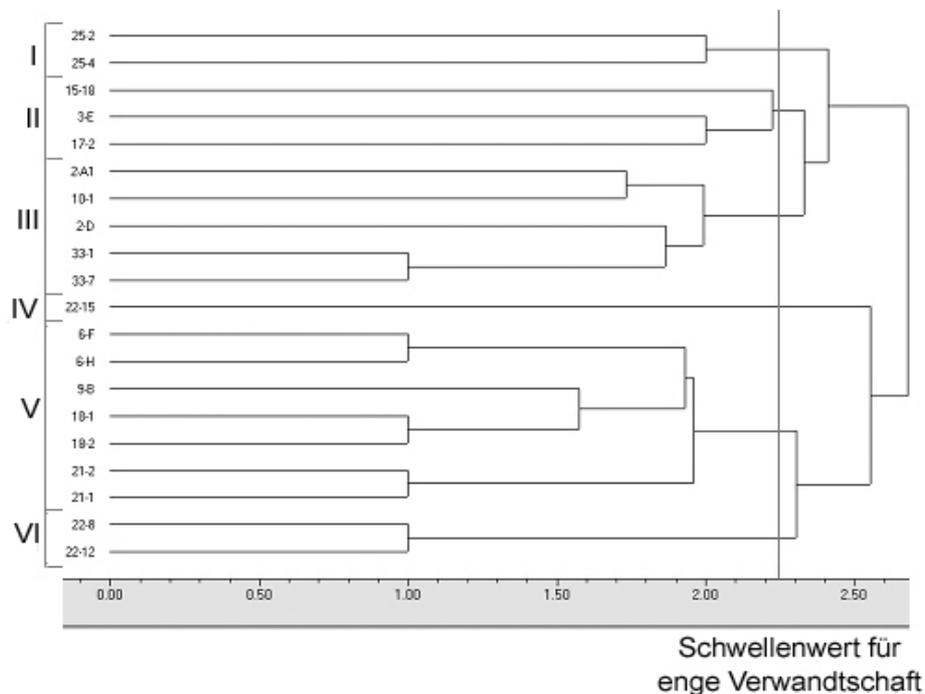


Abbildung 32. Dendrogramm der Klone, die bei einer CD4-Zahl von $< 200/\mu\text{l}$ auftraten

Der mittlere Abstand der Klone bei den Patienten mit hoher CD4-Zahl lag bei $\bar{d}_{(Eu)} = 1,68 \pm 0,55$ ($S_{AB(Dice)} = 0,88$). Auch hier wurden sechs eng verwandte Cluster (Cluster I bis VI) gebildet, denen alle 30 Klone der Patienten mit einer CD4-Zahl von $> 200/\mu\text{l}$ zugeordnet wurden (siehe Abb. 33).

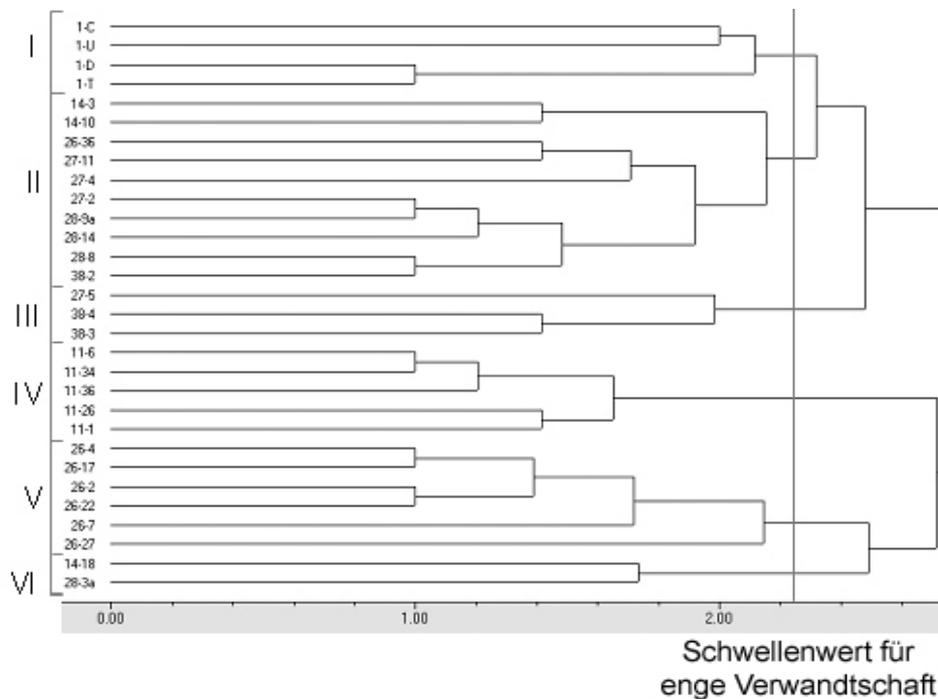


Abbildung 33. Dendrogramm der Klone, die bei einer CD4-Zahl von $> 200/\mu\text{l}$ auftraten.

4.3.6 Genotypische Variabilität von Patienten mit im Vergleich zu Patienten ohne oropharyngeale Candidose

Zum Zeitpunkt der Probenentnahme von *C. dubliniensis* wurde 9-mal eine pseudomembranöse OPC bei dem entsprechenden Patient beobachtet. Unter den neun Isolaten wurden acht unterschiedliche Klone (Klon 2d, 2g, 2q, 2y, 3b, 4a, 5c und 5f) gefunden. Somit wurden 14 % (8/58) aller hier gefundenen Klone im Zusammenhang mit einer OPC beobachtet.

Die Klone, die zu Zeitpunkten isoliert wurden, an denen die Patienten keine OPC zeigten, und die Klone, bei denen eine OPC auftrat, wurden getrennt in den folgenden Dendrogrammen dargestellt.

Die maximale Distanz bei den Klonen, die beim Auftreten einer OPC isoliert wurden, betrug $d_{(Eu)} = 2,49$, der Mittelwert war $\bar{d}_{(Eu)} = 2,10 \pm 0,27$ ($S_{AB (Dice)} = 0,82$). Es entstanden zwei eng verwandte Cluster (Cluster I und II) mit jeweils drei Klonen (siehe Abb. 34). Sechs der acht Klone bildeten enge Cluster. Klon 5c und 2y (Probe 26-4 bzw. 33-7) gehörten zu keinem eng verwandten Cluster und bildeten zusammen einen losen Cluster an einem Knotenpunkt von $d_{(Eu)} = 2,45$ ($S_{AB (Dice)} = 0,77$).

Die maximale Distanz bei den „asymptomatischen Klonen“ betrug $d_{(Eu)} = 2,76$; der Mittelwert war $\bar{d}_{(Eu)} = 1,67 \pm 0,51$ ($S_{AB (Dice)} = 0,88$). Es entstanden sieben eng verwandte Cluster (I bis VII), denen 98 % (48/49) der Proben zugeordnet werden konnten (siehe Abb. 35). Klon 2z (Probe 19-1) war der einzige Klon, der zu keinem engen Cluster gehörte. Er trennte sich von den anderen Klonen an einem Knotenpunkt von $d_{(Eu)} = 2,41$ ($S_{AB (Dice)} = 0,78$). Klinisch bestanden bei Isolation dieses Klons keine Auffälligkeiten.

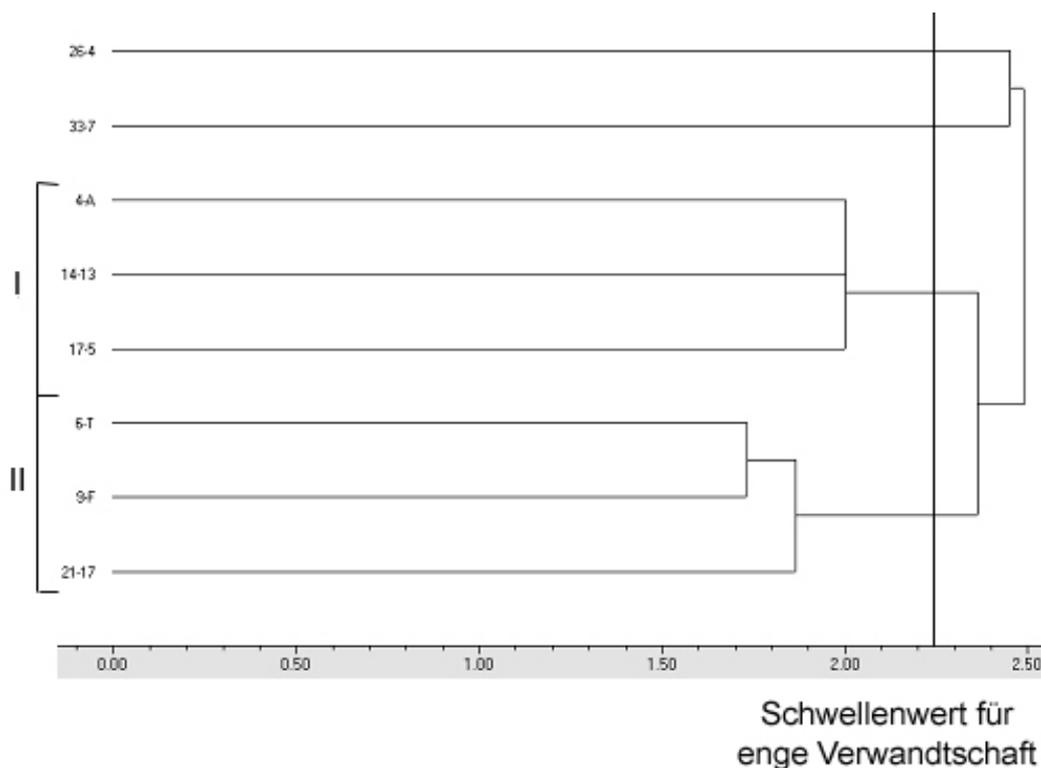


Abbildung 34. Dendrogramm von allen Klonen, die bei Vorliegen einer OPC isoliert wurden

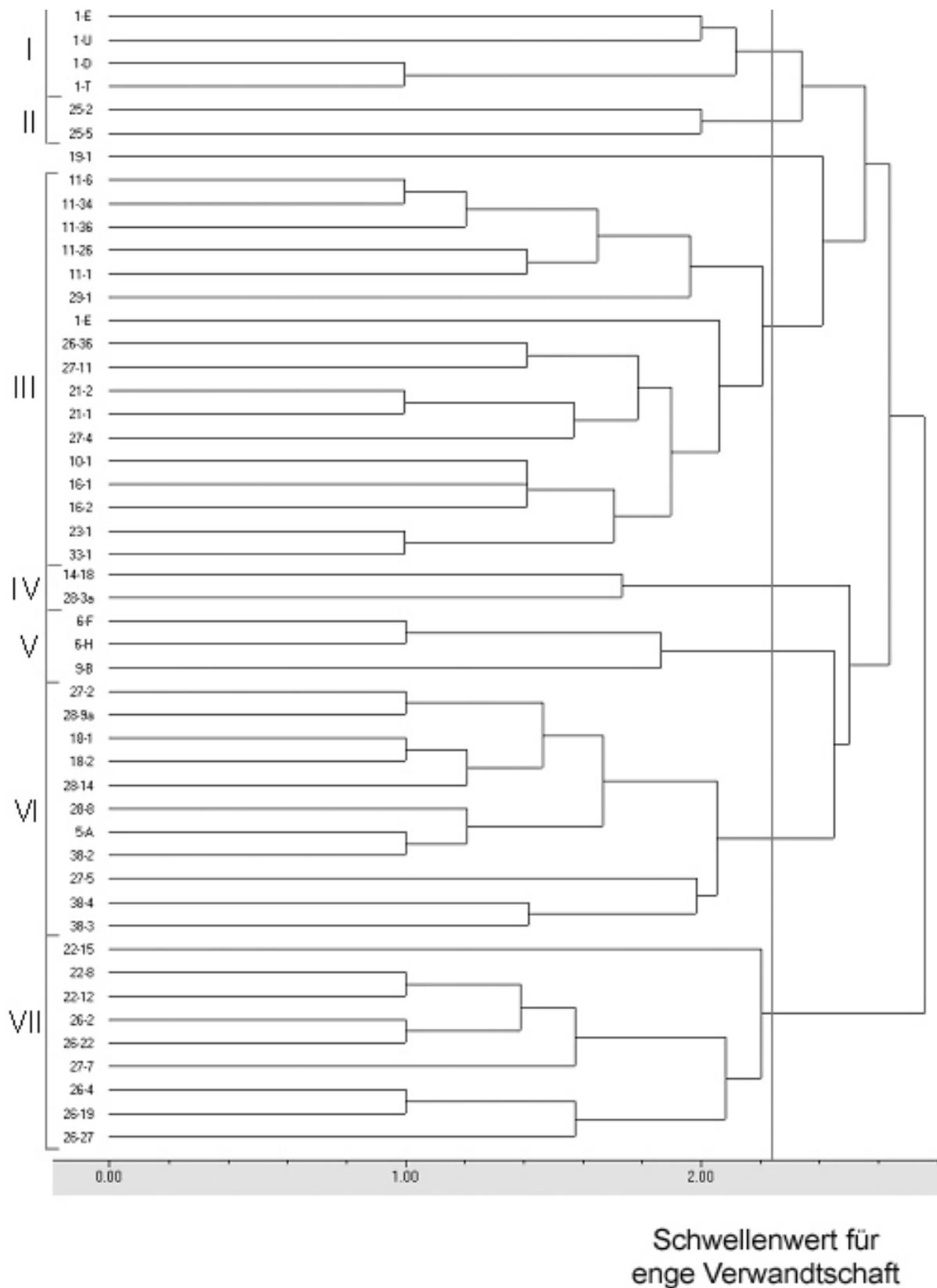


Abbildung 35. Dendrogramm von allen Klonen, die asymptomatisch auftraten

4.3.7 Genotypische Variabilität unter Resistenzentwicklung

Bei der Auswertung wurden nur Isolate berücksichtigt, die nach der NCCLS von 1997 (siehe Tabelle 4) als resistent galten. Der „breakpoint“ (Schwellenwert) für Fluconazol-Resistenz war demnach ein MHK-Wert von $\geq 64 \mu\text{g/ml}$. MHK-Werte von < 32 bis $> 63 \mu\text{g/ml}$ gehörten der Kategorie „intermediär“ an, galten aber ebenfalls als resistent. Bei Itraconazol lag der „breakpoint“ bei einem MHK-Wert von $\geq 1 \mu\text{g/ml}$.

Bei 31 % (9/29) der Patienten entwickelte *C. dubliniensis* eine Resistenz gegen Itraconazol (Patient 3, 13, 14, 17, 21, 25, 26, 27 und 38), bei Patientin 10 erst gegen Itraconazol und dann gegen Fluconazol.

Insgesamt wurden 17 Azol-resistente *C. dubliniensis*-Isolate gefunden. Hiervon bestand bei einer der 194 gegen Fluconazol getesteten *C. dubliniensis*-Isolate (Probe 10-7) eine Resistenz gegen Fluconazol. Insgesamt wurde bei 8 % (16/194) der gegen Itraconazol getesteten *C. dubliniensis*-Isolate eine Resistenz nachgewiesen.

Sieben der acht Patienten, bei denen Resistenz gegen Azole auftrat (bei einem Patienten fehlt diese Information), und neun der 13 Patienten, bei denen keine resistenten *C. dubliniensis*-Isolate vorkamen, waren antimykotisch vorbehandelt. Auf die einzelnen Proben bezogen bedeutet das, dass bei 88 % (14/16) der resistenten und bei 68 % (114/167) der sensiblen *C. dubliniensis*-Isolate eine Vorbehandlung mit Antimykotika bestand, wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war ($p = 0,188$). Insgesamt bestanden bei 128 aller hier untersuchten *C. dubliniensis*-Stämme eine Vorbehandlung mit Antimykotika, bei 11 % (14/128) führte diese zur Resistenzentwicklung, in 89 % der Fälle (114/128) blieben die *C. dubliniensis*-Stämme sensibel.

Die 17 gegen Itraconazol oder Fluconazol resistenten *C. dubliniensis*-Isolate gehörten 13 verschiedenen Cd25 Genotypen an. Bei 14 resistenten Isolaten lagen vollständige Informationen vor. In Bezug auf den Genotyp trat Azol-Resistenz unter folgenden Bedingungen auf: Bei drei der 14 resistenten Isolate (21 %) korrelierte der Austausch des Genotyps eindeutig mit Resistenzentwicklung. Zwei der 14 resistenten Isolate (14 %) wurden sukzessiv unter persistierendem Genotyp resistent. Das trifft auch für das gegen Fluconazol resistente Isolat zu. Bei ebenfalls zwei der resistenten Isolate fand ein Austausch gegen einen anderen sensiblen Genotypen statt. Bei sieben resistenten Isolaten (50 %) gab es keine Korrelation zwischen Resistenz und Cd25 Genotyp (siehe auch Tabellen 15 bis 44):

1. Resistenz ging mit Veränderung des Genotyps einher

Bei Patient 38 trat bei Resistenzentwicklung von Klon 6f gegen Itraconazol ein Ersatz durch den sensiblen Klon 6a auf (siehe Abb. 36). Vor Isolation der ersten *C. dubliniensis*-Probe wurde der Patient antimykotisch behandelt. Zum Zeitpunkt aller hier aufgeführten Probenentnahmen bestand keine Behandlung.

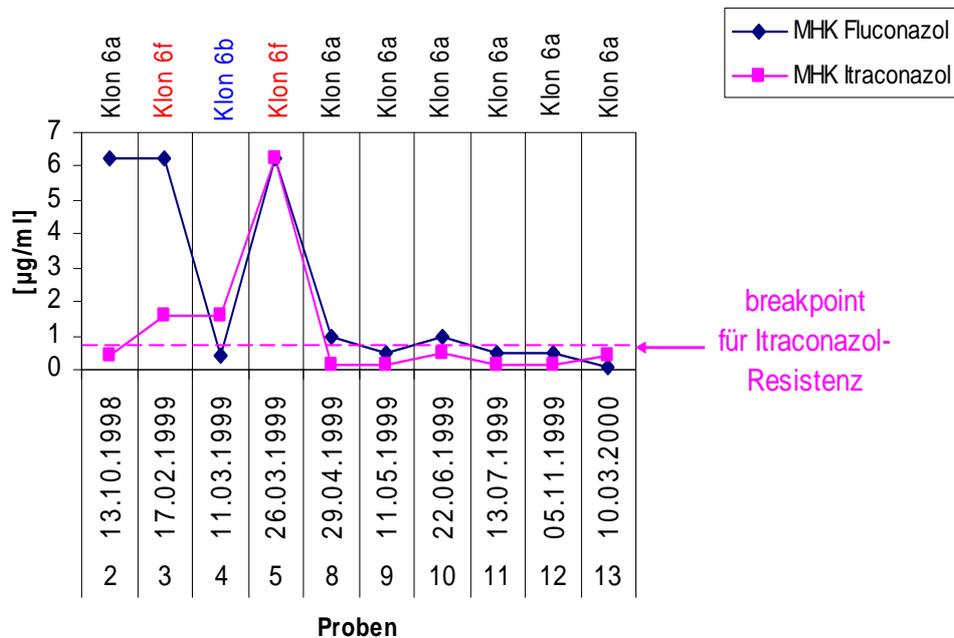


Abbildung 36. Resistenzentwicklung bei Patient 38

2. Sukzessiver Anstieg der MHK-Werte bei persistierendem Genotyp

Dieser Fall trat bei Patient 21 und bei Patientin 10 ein. Dargestellt ist beispielhaft Patient 21 (siehe Abb. 37). Der zum Ende persistierende Klon 5f bildete simultan Resistenz gegen Itraconazol und Fluconazol aus. Seit Isolation der Probe 21-13 wurde Fluconazol in unterschiedlichen Dosierungen verabreicht.

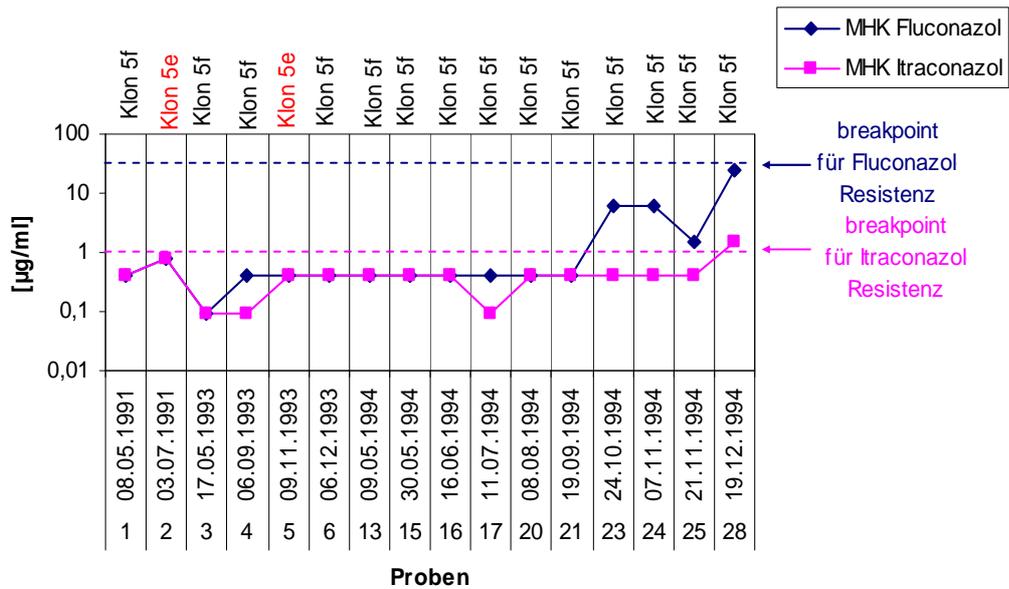


Abbildung 37. Resistenzentwicklung bei Patient 21

3. Austausch des resistenten Klons gegen einen anderen sensiblen Klon

Dieser Fall trat bei Patient 25 und 26 ein. Dargestellt ist beispielhaft Patient 25 (siehe Abb. 38). Der gegen Itraconazol resistent gewordene Klon 2w wurde durch den sensiblen Klon 2h ersetzt. Intermittierend wurde über den ganzen Zeitraum Fluconazol verabreicht. Die MHK von den Proben 25-2a und 25-2b konnte nicht bestimmt werden, weil die Kultur nach dem Einfrieren nicht mehr anwuchs.

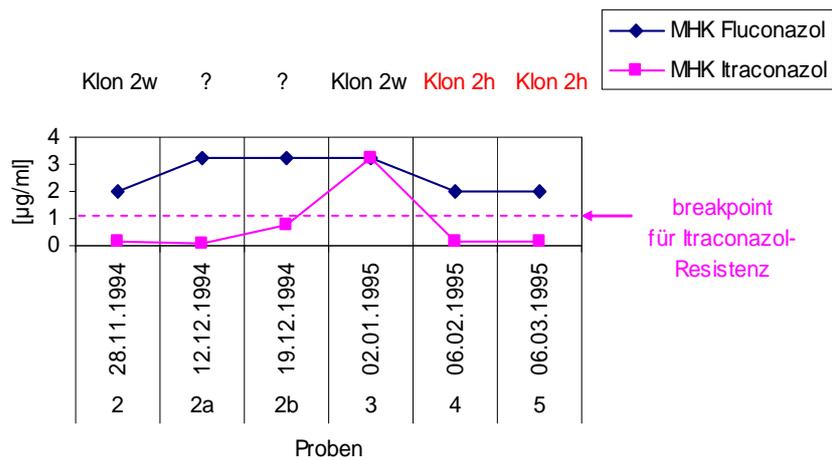


Abbildung 38. Resistenzentwicklung bei Patient 25

4. Zwischen der Entwicklung einer Resistenz und dem Cd25 Genotyp konnte kein Zusammenhang hergestellt werden

Bei Patient 3 und 10 persistierte der Genotyp über den ganzen Zeitraum trotz Resistenzentwicklung. Der Genotyp der gegen Itraconazol resistenten Isolate war vor und nach dem Auftreten der Resistenz sensibel für Itraconazol. Bei Patient 14, 26 und 27 konnte kein Zusammenhang zwischen dem Wechseln des Genotyps und der Entstehung einer Resistenz hergestellt werden. Beispielhaft ist Patient 14 dargestellt (siehe Abb. 39). Klon 2d wurde zweimal resistent gegen Itraconazol, war aber beide Male sowohl vorher als auch nachher sensibel für Itraconazol. Bei Isolation der Probe 14-10 wurde der Patient prophylaktisch mit zweimal wöchentlich 100 mg Fluconazol behandelt. Zum Zeitpunkt der übrigen Probenentnahmen wurde keine antimykotische Therapie verabreicht.

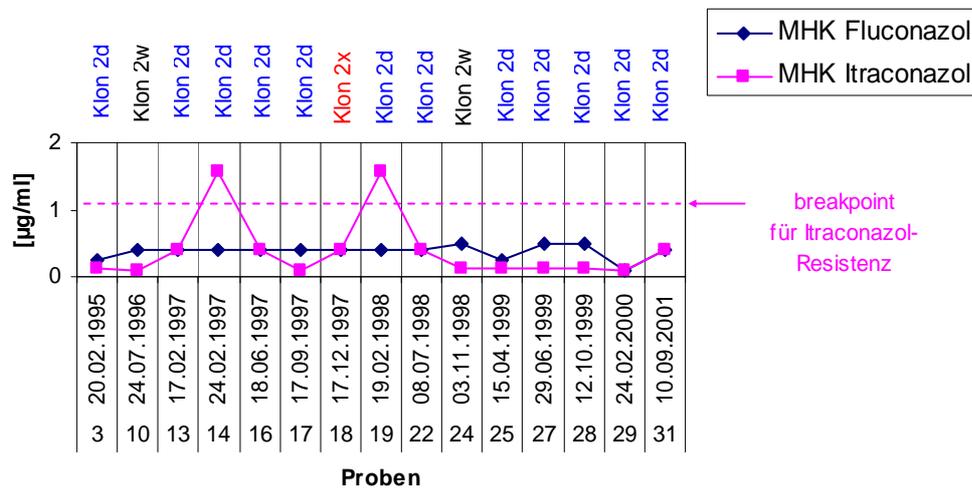


Abbildung 39. Resistenzentwicklung bei Patient 14

5 Diskussion

5.1 Methoden

5.1.1 Identifizierungstests für *C. dubliniensis*

Die Validitätsparameter Sensitivität und Spezifität eines diagnostischen Tests geben Auskunft über richtig positive bzw. richtig negative Befunde. Der Youden-Index Y macht eine Aussage über den Zusammenhang zwischen dem Testergebnis und dem tatsächlichen Vorliegen von in diesem Fall *C. dubliniensis* (siehe auch Kapitel 4.1.7).

Die Spezifität war in allen fünf in dieser Arbeit durchgeführten Tests zur Identifizierung von *C. dubliniensis* relativ gut (Mittelwert $\bar{x} = 98 \%$). Es bestand bei diesen Tests also eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass bei einem negativen Testergebnis tatsächlich nicht *C. dubliniensis* vorlag.

Die Sensitivität, das heißt, die Wahrscheinlichkeit, dass *C. dubliniensis* als solcher identifiziert werden konnte, war bei den Tests sehr unterschiedlich und wird im folgendem Teil dargestellt und diskutiert.

Für die **Arbitrarily Primed Polymerase Kettenreaktion (AP-PCR)** mit dem Primer RP02 wurden die Gütekriterien eines diagnostischen Tests nicht berechnet, weil diese Methode als Referenz bzw. als Goldstandard definiert wurde.

Abgesehen von einer Ausnahme stand das Ergebnis der AP-PCR nicht im Widerspruch zu der Mehrheit der Ergebnisse aus den anderen Identifizierungsmethoden. Bei dieser Ausnahme handelte es sich um Probe 11-19, die mittels AP-PCR als *C. albicans* identifiziert wurde, wobei alle übrigen Identifizierungsmethoden für das Vorliegen von *C. dubliniensis* sprachen. Es ist also wahrscheinlich, dass die AP-PCR zu einem falschen Ergebnis geführt hatte. Zur Verifizierung dieser Hypothese würde die Möglichkeit der Sequenzierung bestehen, die hier nicht wahrgenommen wurde.

Berechnet man die Gütekriterien der AP-PCR gegen das Gesamtergebnis der anderen Identifizierungsmethoden für *C. dubliniensis*, ergibt sich eine Spezifität von 99,7 % (140/141) und eine Sensitivität von 100 %.

Bei der AP-PCR mit dem Primer RP02 handelt es sich also um ein sehr effektives Verfahren zur Identifizierung von *C. dubliniensis* und zur Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Es unterscheidet sich durch die anderen Identifizierungstests dadurch, dass es unterschiedliche Spezies auf DNS-Ebene voneinander unterscheidet und nicht aufgrund von phäno- oder biotypischen Charakteristika.

In der Literatur sind diverse andere AP-PCR-Methoden mit unterschiedlichen Primern beschrieben, die es ebenfalls ermöglichen sollen, zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans* zu unterscheiden (27,53,83).

Für die Amplifikation mittels AP-PCR wird nur ein kurzer Primer (ca. 10 Basenpaare lang) mit zufälliger Sequenz verwendet, der mit unterschiedlichen Bereichen im Genom hybridisiert. Die „Annealing“ Temperatur ist gering, damit der Primer auch an Sequenzen binden kann, die nur teilweise komplementär sind. Die Amplifikation führt zu einem Bandenmuster, das unter standardisierten Bedingungen reproduzierbar ist. Die Amplifikationsbedingungen müssen so eingestellt werden, dass eine möglichst große Anzahl von Banden entsteht, die gut auswertbar ist. Bei geringen Veränderungen der Bedingungen (z. B. unterschiedliche Thermocycler oder verschiedene Marken Taq Polymerase) verschlechtert sich die Reproduzierbarkeit (68,124).

Die höchste Sensitivität und den höchsten Youden-Index aller Identifizierungsmethoden zeigte die Kultivierung der Isolate auf *Cryptococcus*-Agar nach Staib (Sensitivität 98 %, Youden-Index 0,95). Die Sensitivität dieses Tests war als einzige nicht signifikant schlechter als die der Referenzmethode AP-PCR ($p = 0,0784$).

Die zweitbeste Sensitivität und den zweitbesten Youden-Index erreichte die Testung des Wachstumsverhaltens bei 45 °C (Sensitivität 96 %, Youden-Index 0,94). Vergleichend wurde die Sensitivität für das Wachstumsverhalten bei 42 °C bestimmt. Sie war mit 3 % inakzeptabel bei entsprechend schlechtem Youden-Index (0,03) trotz guter Spezifität (100 %), so dass die Differenzierung von *C. albicans* und *C. dubliniensis* immer bei 45 °C erfolgen sollte. Die gleiche Empfehlung geben Pinjon et al. (91), obwohl die Sensitivität für den Wachstumstest bei 42 °C hier mit 91 % wesentlich besser war.

Die Biotypisierung mit dem API® ID 32 C-System hatte mit 94 % die drittbeste Sensitivität (Youden-Index 0,93).

Die Sensitivität der drei letztgenannten Tests war signifikant schlechter als die der AP-PCR ($p = 0,0036$ bei 45 °C bzw. $p > 0,0001$ bei 42 °C bzw. $p = 0,0006$ beim API).

Die Kultivierung auf **Staibagar** ist ein methodisch sehr einfaches Verfahren, bei der die Ränder der Kolonien makroskopisch als rau oder als glatt zu beurteilen sind. Zur Hilfestellung kann man mikroskopisch das Wachstum von Chlamydosporen kontrollieren, durch die die rauhen Ränder bedingt sind. Normalerweise wird *Cryptococcus*-Agar (auch Negersaat Agar oder Birdseed Agar genannt) zur selektiven Isolierung und Identifizierung von *Cryptococcus neoformans* verwendet. Staib und Morschhäuser entdeckten 1999, dass sich dieser Agar auch zur Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* eignet (113).

Auch der **Wachstumstest bei 45 °C** ist ein simples und preisgünstiges Verfahren. Nach dem Ausplattieren des Isolats und Inkubation bei entsprechender Temperatur ist nur zu beurteilen, ob das Isolat gewachsen ist oder nicht.

Der Vorteil bei der **Biotypisierung mit ID 32 C** besteht vor allem in der relativen Objektivität des Tests. Mögliche Testergebnisse sind „Trübung“, was eine Assimilation des entsprechenden Zuckers bedeutet, oder „keine Trübung“, was keine Assimilation bedeutet. Diese Entscheidung ist durch die Möglichkeit des Vergleichs zu den anderen Assimilationsreaktionen relativ einfach zu treffen. Eine Fehlerquelle liegt in der Möglichkeit von Feuchtigkeitsbrücken zwischen den Vertiefungen des Teststreifens beim Verschließen, so dass auf diesem Wege die Minimalmedien miteinander vermischt werden können. Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Tatsache, dass gerade bei der Unterscheidung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* oft nur eine einzige Assimilationsreaktion ausschlaggebend ist. Bei zu frühem Ablesen kann es zu falschen Diagnosen kommen. So ist beispielsweise der *C. dubliniensis*-typische API®-Code 7143.1400.15 nach Angabe des Herstellers erst nach 48 h repräsentativ. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Biotypisierungen mit dem API®-Kit wurden aus diesem Grund erst nach 48 h abgelesen, obwohl nach Anleitung des Kits eine Ablesung schon nach 24 h erfolgen kann.

Die bisher publizierten API®-Codes für *C. dubliniensis* sind: 7142.1400.15, 7143.1400.15, 7142.1000.15, 7143.1000.15 und 7042.1000.11 (90,116,119).

93 % (197/212) der von mir getesteten *C. dubliniensis*-Isolate hatten einen API®-Code, der bereits für *C. dubliniensis*-Isolate publiziert wurde. Zwei Isolate hatten *C. dubliniensis*-typische API®-Codes, die bisher nicht publiziert wurden (7042.1000.15 und 7142.1400.11). Die beiden anderen publizierten API®-Codes (7143.1000.15 und 7042.1000.11) kamen unter den *C. dubliniensis*-Isolaten dieser Arbeit nicht vor. 6 % (13/212) der *C. dubliniensis*-Isolate hatten Codes, die nach Hersteller-Angaben eigentlich *C. albicans* zugeordnet werden.

Für die Unterscheidung zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans* sind die Kohlenhydrate am Besten geeignet, bei denen der Prozentsatz der Assimilation bei beiden Spezies am unterschiedlichsten ist. Nach meinen Ergebnissen eignen sich die Zucker Methyl- α -D-Glukopyranosid (6 % Assimilation von *C. dubliniensis* versus 99 % Assimilation bei *C. albicans*), Xylose (5 % versus 97 %) und Trehalose (7 % versus 100 %) am Besten. Nach einer Studie von Pincus et al. (90), bei der 80 *C. dubliniensis*-Isolate untersucht wurden, sind die am Besten geeigneten Kohlenhydrate Laktat (0 % Assimilation von *C. dubliniensis* versus 96 % Assimilation bei *C. albicans*), Methyl- α -D-Glukopyranosid (0 % versus 98 %), Xylose (0 % versus 98 %) und Trehalose (30 % versus 97 %). Im Gegensatz dazu wurde Laktat in meinen Tests nur zu 4 % von *C. albicans* und zu 0,5 % von *C. dubliniensis* assimiliert und scheint somit für deren Differenzierung nicht geeignet zu sein. Vom Hersteller des ID 32 C-Systems gibt es eine Statistik, die Auskunft darüber gibt, wie viel Prozent der Stämme einer Spezies die einzelnen Zucker assimilieren (API®-Datenbank). In Übereinstimmung mit der Studie von Pincus et al. (90) wird laut API®-Datenbank Laktat ebenfalls zu 96 % von *C. albicans* assimiliert. Meine Ergebnisse stimmten hinsichtlich der Laktatassimilation bei *C. dubliniensis* neben den Ergebnissen von Pincus et al. (90) auch mit denen aus der ursprünglichen Spezies Beschreibung von Sullivan et al. (64 untersuchte Isolate) (119) überein (0,5 %). Nach API®-Datenbank sind es 10 % der *C. dubliniensis*-Stämme, die Laktat assimilieren können. Bei anderen Autoren (106,121) zeigten die *C. dubliniensis*-Stämme eine Laktatassimilation von bis zu 86 % (12 bzw. 53 untersuchte Isolate). In dieser Arbeit wurden Methyl- α -D-Glukopyranosid und Xylose zu 6 % bzw. zu 5 % assimiliert, während nach API®-Datenbank, Pincus et al. (90), Salkin et al. (98) (10 Isolate untersucht), Alves et al. (6) (19 Isolate untersucht) und nach der ursprünglichen Beschreibung als neue Spezies (119) keiner *C. dubliniensis*-Stämme diese beiden Zucker assimilieren konnte. In anderen Arbeiten (21, 12 bzw. 53 untersuchte Isolate) (54,106,121) assimilierte *C. dubliniensis* Xylose bis zu einem Prozentsatz von 57 %.

Trehalose wurde bei mir zu 7 % assimiliert, während nach API®-Datenbank 0 % diesen Zucker assimilieren. In der Studie von Pincus et al. (90) waren es 30 % der Stämme. Mein Ergebnis stimmt diesbezüglich also eher mit der API®-Datenbank überein. In der Arbeit von Kurzai et al. (54) konnten sogar 100 % der getesteten *C. dubliniensis*-Stämme Trehalose assimilieren. In dieser Arbeit assimilierten 88 % der Isolate Palatinose, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Pincus et al. (90) steht (91 %). Laut API®-Statistik können nur 1 % der *C. dubliniensis*-Stämme Palatinose assimilieren.

Zwischen meinen bzw. den Ergebnissen der genannten Autoren und der API®-Statistik, auf der die Zuordnung von den Assimilationsreaktionen zu den entsprechenden Spezies beruht, gibt es einige Widersprüche. In dieser Arbeit wurden 212 *C. dubliniensis*-Isolate mit dem ID 32 C untersucht. Eine so große Anzahl von Proben wurde bisher nicht untersucht, wobei die *C. dubliniensis*-Isolate von 30 Patienten stammten, also keine unabhängigen Isolate darstellen. Die meisten Isolate (n = 80) wurden bisher von Pincus et al. (90) untersucht. Hier stammten die Isolate aus einer Stammsammlung, wobei unklar ist, ob diese unabhängig voneinander gewonnen wurden oder nicht.

Die Widersprüche mögen verantwortlich für die Rate der Missidentifizierungen von *C. dubliniensis* (hier 6 %) sein. Die kritischen Kohlenhydrate, das heißt, die Zucker, bei denen Widersprüche zwischen meinen Ergebnissen und der API®-Statistik aufgetaucht sind, sind Methyl- α D-Glukopyranosid, Xylose, Trehalose und Palatinose. Meine Ergebnisse zeigen entgegen der Erstbeschreibung (119) und in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Kurzai, Mähnß, Schoofs und Tintelnot (54,58,106,121), dass *C. dubliniensis* Xylose und Methyl- α D-Glukopyranosid assimilieren kann.

Die geringsten Sensitivitäten zeigten sich bei der Kultivierung auf CHROMagar® Candida mit 15 % (Youden-Index 0,14) und auf Reisagar mit 34 % (Youden-Index 0,32). Die Sensitivität beider Methoden war signifikant schlechter als die der Referenzmethode AP-PCR (beide $p < 0,0001$).

Hefekolonien färben sich auf **CHROMagar® Candida** aufgrund der unterschiedlichen β -N-Acetylgalaktosaminase-Aktivität unterschiedlich an, was es möglich macht, verschiedene *Candida*-Spezies voneinander zu unterscheiden. Es ist eine geeignete Methode, um Mischkulturen voneinander zu trennen, um sie unabhängig voneinander

weiterzuverarbeiten. Das schlechte Ergebnis in dieser Arbeit könnte dadurch erklärbar sein, dass viele Proben über einen zum Teil jahrelangen Zeitraum in Magermilch bei -20 °C eingefroren waren, dann rekultiviert und auf CHROMagar® Candida ausplattiert wurden. Die dunkelgrüne Farbexprimierung kann dann mangelhaft und eine Differenzierung zu der etwas helleren grünen Farbexprimierung von *C. albicans* unmöglich sein (106).

Etwa die Hälfte (116/222) der in dieser Arbeit untersuchten *C. dubliniensis*-Isolate wurde vor der Erstbeschreibung dieser Spezies gewonnen. Charakteristische Merkmale, wie die Ausbildung von kurzen Pseudomyzelien oder Triplets auf **Reisagar** wurden erst danach dokumentiert. Eine Wiederholung der Tests war bei einem Teil der alten Isolate nicht möglich, nachdem diese nicht mehr rekultivierbar waren. Dieser Umstand könnte eine Ursache für die schlechte Sensitivität der Methode darstellen. Somit macht es Sinn, die Gütekriterien für die Kultivierung auf Reisagar extra für die Zeit nach 06/96 anzugeben. Die Sensitivität beträgt dann 54 % (62/116), falsch negativ sind 47 % (54/116), die Spezifität beträgt 91 % (42/46) und falsch positiv sind 9 % (4/46). Der Youden-Index beträgt 0,5. Diese Ergebnisse sind besser als die, die unter Einbeziehung der bis 1996 gewonnenen Isolate erzielt wurden, dennoch sind die Gütekriterien dieses Tests nicht befriedigend.

Generell hängen die Testergebnisse auf CHROMagar® Candida und auf Reisagar im Gegensatz zu der Kultivierung auf Staibagar und dem Wachstumstest bei 45 °C sehr von der Erfahrung der Person ab, die diese Tests abliest und interpretiert. Die Agarplatten müssen sehr differenziert betrachtet und nach möglichen spezies-typischen Hinweisen abgesucht werden. Am Besten sind die Tests im Vergleich mit Kontrollstämmen abzulesen.

Ähnlich unbefriedigende Ergebnisse, was die Zuverlässigkeit von phänotypischen Methoden zur Diskriminierung zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans* betrifft, haben auch andere Autoren erzielt. Kurzai et al. (54) und Hartung de Capriles et al. (38) kamen zu dem Schluss, dass die Beurteilung der Kolonie-Morphologie auf Staibagar der einzige phänotypische Test ist, der ebenso gute diskriminatorische Eigenschaften hat wie molekulare Methoden. Das Wachstumsverhalten und der ID 32 C erreichten in diesen Studien keine befriedigenden Ergebnisse. Sehr gute Ergebnisse auf Staibagar

erlangten auch die Erstbeschreiber von *Cryptococcus*-Agar zur Identifizierung von *C. dubliniensis* (113). Eine 100 %-ige Sensitivität und Spezifität erreichten Pinjon et al. (91) für den Wachstumstest bei 45 °C. Sehr gute Ergebnisse für die Testung auf CHROMagar® Candida und bei 45 °C Wachstumstemperatur erzielten Giammanco et al. (31) mit einer Sensitivität von jeweils 100 %. In den meisten anderen Studien wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit CHROMagar® Candida als insuffiziente Methode für die Differenzierung zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans* beschrieben (38,54,58,121).

Um die Zuverlässigkeit der Identifizierung zu erhöhen, sollten immer mehrere Tests in Kombination miteinander durchgeführt werden (58). Ich schlage folgenden Untersuchungsablauf vor: Erst sollte die Trennung von *C. albicans* und *C. dubliniensis* (grüne Kolonien) von anderen *Candida* Sp. auf CHROMagar® Candida erfolgen. Die weitere Differenzierung sollte nach folgendem Flussdiagramm erfolgen: Erst erfolgt die Kultivierung auf Staibagar bei den auf CHROMagar® Candida grün gefärbten Kolonien. Bei Chlamydo-sporen-Wachstum, was typisch für *C. dubliniensis* ist, sollte das Ergebnis durch Beurteilung des Wachstumsverhaltens bei 45 °C und die Durchführung des API® ID 32 C bestätigt werden.

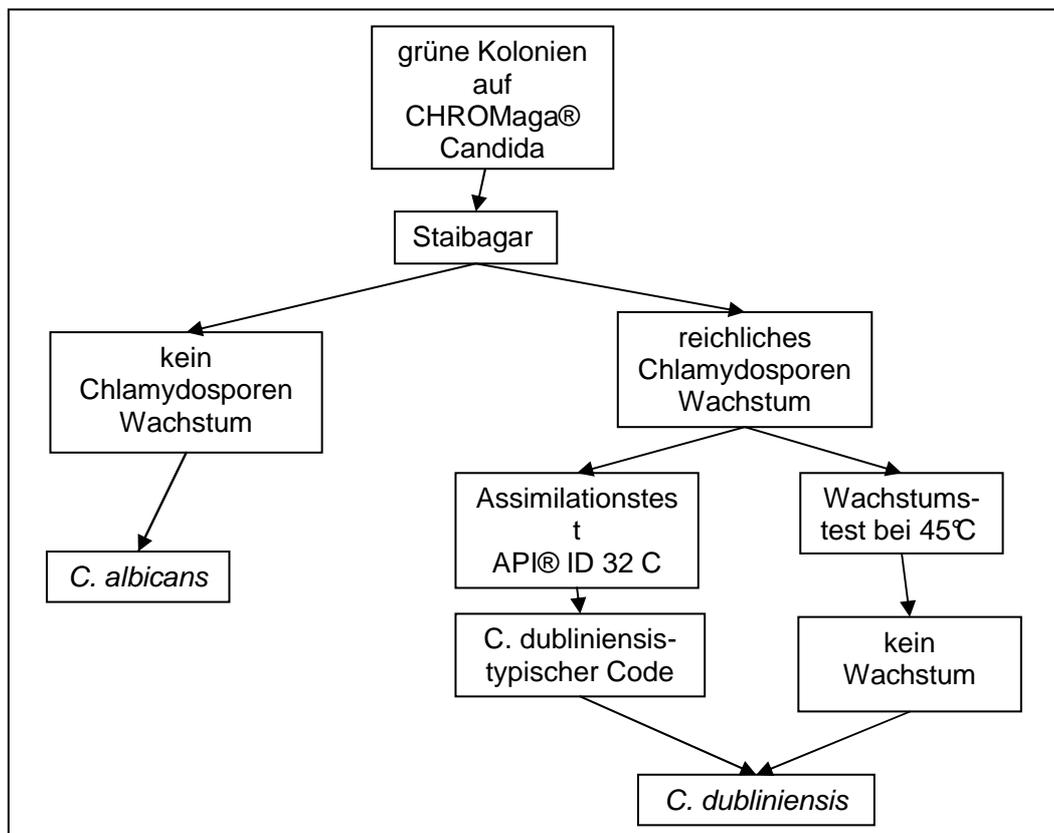


Abbildung 40. Flussdiagramm für den vorgeschlagenen Untersuchungsablauf zur Identifizierung von *C. dubliniensis*

In dieser Arbeit wurden 132 der in der AP-PCR als *C. dubliniensis* identifizierten Isolate nach dem vorgeschlagenen Schema getestet. Hiervon wurden 91 % (120/132) mit übereinstimmenden Ergebnissen in allen vier Tests als *C. dubliniensis* erkannt. 3 % (4/132) der Isolate hatten auf Staibagar ein glattes Wachstum, so dass sie gar nicht erst in die Bestätigungstests (Wachstumsverhalten bei 45 °C und API® ID 32 C) eingingen. Bei einem der 132 Isolate fielen beide Betätigungstests negativ aus, sie wurden somit auch nicht als *C. dubliniensis* erkannt. Bei 5 % (7/132) der *C. dubliniensis*-Isolate war einer der zwei Bestätigungstests nicht richtig. Diese wurden mit einem positiven Betätigungstest als *C. dubliniensis* gewertet. Zusammenfassend bedeutet das, dass 96 % (127/132) der Isolate mit dem vorgeschlagenen Flussdiagramm richtig identifiziert werden konnten, was einer guten Sensitivität zur Identifizierung von *C. dubliniensis* entspricht.

Die in Kapitel 3.4.3 beschriebene Genotypisierung kann auch als Identifizierungsmethode genutzt werden. 207 der 208 getesteten *C. dubliniensis*-Stämme generierten ein komplexes Bandenmuster, entsprechend einer Sensitivität von nahezu 100 %. Die Spezifität kann nicht berechnet werden, weil nur *C. dubliniensis*-Stämme getestet wurden. Das Verfahren ist allerdings für den Laboralltag viel zu aufwendig und teuer, als dass es als Identifizierungstest für *C. dubliniensis* eine praktische Bedeutung hätte.

Es wurden viele weitere phänotypische Testmethoden wie z. B. die Kultivierung auf Sonnenblumenkern Agar (Synonym: Pal's Agar), Tomatensaft Agar oder Tabak Agar beschrieben (3,5,47). Zudem wurde 2006 von Marot-Leblond et al. (59) ein monoklonaler Antikörper entwickelt, der spezies-spezifisch an ein Oberflächen-Antigen von *C. dubliniensis* bindet. Aus diesem Antikörper wurde ein kommerzieller Latex-Agglutinationstest entwickelt (Bichro-dubli Fumouze test®, Fumouze diagnostics), der sehr viel versprechend für eine schnelle und sichere Identifizierung von *C. dubliniensis* im Routine-Labor ist (23,97). Auf diese Methoden soll hier jedoch nicht weiter eingegangen werden.

5.1.2 Genotypisierung von *C. dubliniensis*

DNS-Extraktion und Verdau

Unter optimalen Bedingungen schneidet das Enzym EcoR I an der Erkennungssequenz 5' G' AATT C 3', 3' C TTAA`G 5'. Unter sub-optimalen Bedingungen (z. B. zu hohe Glycerol-Konzentrationen, zu hohe pH-Werte, Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln) ist eine unspezifische Spaltung der DNS zu beobachten. Dieses Phänomen ist als Ursache für die negative Hybridisierung mit der Gensonde Cd25 bei acht Proben zu betrachten (120).

Southern Blot

Die Durchführung eines Southern Blots zur Fixierung von elektrophoretisch getrennter DNS ist einfach und preisgünstig. Die hier verwendete Blottechnik (22,112) ermöglicht durch leicht alkalotische Bedingungen und das Nutzen der Schwerkraft einen Transfer der DNS innerhalb von 1 Stunde.

Manche Autoren empfehlen zur besseren Fixierung der DNS die Nylon-Membranen zu „cross-linken“ (Bestrahlung mit UV-Licht) und nicht wie die herkömmlichen Nitrozellulose-Membranen 2 Stunden zu backen (75). In dieser Arbeit wurden Nylon-Membranen gebacken, was aufgrund der schlechteren Bindung eine Ursache dafür sein könnte, weshalb die Filme sehr lange mit den radioaktiv markierten Blots exponiert werden mussten, um ein ausreichend starkes Bandenmuster auf den Filmen zu generieren.

Markierung

Bei den ersten Southern Blots wurde die Sonde Cd25 mit dem kommerziellen Kit Alkphos Direkt® markiert. Es basiert auf dem Enzym Alkalische Phosphatase. Diese Markierungsmethode soll eine höhere Sensibilität (0,06 pg) haben als das alternative radioaktive Markierungssystem Megaprime® (25 ng) ohne ein Gefahrenpotential durch radioaktive Strahlung (Amersham Biosciences, Freiburg). In dieser Arbeit wurden Nylonmembranen verwendet, weil diese wesentlich stabiler und haltbarer sind als die klassischen Nitrozellulose-Membranen. Leider entstand bei der Markierung mit Alkalischer Phosphatase ein sehr starker Hintergrund, was ein häufig beobachtetes Problem darstellt (75). Aus diesem Grund erfolgte die Markierung der Sonde letztendlich radioaktiv mit dem Kit Megaprime®.

Genotypisierung

Die Sonde Cd25 der Arbeitsgruppe Joly et al. (44) wurde verwendet, weil sie sich im Vergleich mit anderen „DNS-fingerprinting-Sonden“ als die einzige spezie-spezifische für *C. dubliniensis* erwies.

Ein Problem bei der Auswertung der komplexen „fingerprint-Muster“ bestand darin, dass die Software nur einen kleinen Teil der Banden, die man mit dem Auge erkennen konnte, automatisch detektierte, bzw. nicht zwischen zwei dicht beieinander liegenden Banden differenzieren konnte. Die manuelle Nachbearbeitung hatte eine gewisse Testungenaugigkeit zur Folge. Für epidemiologische Fragestellungen sind DNS-basierte Typisierungsmethoden sehr etabliert, weil sie durch die Generierung von sehr komplexen Bandenmustern eine hohe diskriminatorische Kapazität haben. Um unterschiedliche Stämme im Vergleich als identisch zu werten, ist möglicherweise keine 100 %-ige Übereinstimmung der Bandenmuster notwendig (120).

Andere Methoden, um DNS „fingerprint-Muster“ zu generieren, sind elektrophoretische Karyotypisierung, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, AP-PCR (auch RAPD für Randomly amplified polymorphic DNA genannt), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) und Mini- bzw. Mikrosatelliten-Analysen (78). Darauf soll hier nicht weiter eingegangen werden.

5.2 Klinische Bedeutung von *C. dubliniensis*

Oropharyngeale Candidose und *C. dubliniensis*

4 % (9/208) der *C. dubliniensis*-Isolate waren an einer OPC beteiligt, vier dieser *C. dubliniensis*-Isolate traten als Monokultur und fünf als Mischkultur (zusammen mit *C. glabrata* oder *C. krusei*) auf. Bei zwei der fünf Mischkulturen wurde *C. dubliniensis* in höherer Konzentration [KBE/ml] nachgewiesen als die jeweilige Mischkultur. Bei den *C. dubliniensis*-Isolaten, die in Monokultur oder in höherer Konzentration als die Mischkultur vorlagen, ist davon ausgehen, dass *C. dubliniensis* der ursächliche Keim für die OPC war. Auf die Gesamtzahl der *C. dubliniensis*-Isolate bezogen heißt das somit, dass *C. dubliniensis* in 3 % (6/208) eine OPC verursachte. Alle Patienten, bei denen *C. dubliniensis* an einer OPC beteiligt war, waren HIV-infiziert. Es konnte also bestätigt

werden, dass *C. dubliniensis* das Potential hat, oropharyngeale Infektionen der Mundhöhle bei HIV-Patienten hervorzurufen.

Diese Beobachtung wurde bereits von Coleman et al. (24) gemacht, ist aber in der Literatur sehr selten beschrieben. Auch für andere Non-*C. albicans* Sp. wie *C. glabrata*, *C. krusei*, oder *C. tropicalis* konnte dieses Potential gezeigt werden (93).

Die biologische Grundlage der Virulenz von *C. dubliniensis* ist bis heute nicht gänzlich geklärt. Es gibt vergleichende Studien zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans* mit sehr kontroversen Ergebnissen, bei denen untersucht wurde, wodurch der Übergang eines kommensalen Keims in einen pathogenen Keim zustande kommt (15,25,32,37,40,43,50,63). Die Daten dieser Arbeit sprechen für eine sehr geringe Virulenz von *C. dubliniensis*.

Interessanterweise waren hier beim Vorliegen einer OPC Mischkulturen zusammen mit *C. glabrata* mit 54 % am häufigsten und nicht wie in der Literatur beschrieben mit *C. albicans* (24,106). Mischkulturen mit *C. albicans* kamen beim Vorliegen einer OPC hier gar nicht vor. Eine mögliche Ursache könnte der zunehmende Gebrauch von Antimykotika sein, der zur Selektion von *Candida* Sp. führt, die natürlicherweise weniger empfindlich auf diese Substanzen reagieren (21,79,93). Bei acht der neun *C. dubliniensis*-Isolate, die bei einer klinisch manifesten OPC gewonnen wurden, waren die Patienten mit Fluconazol vorbehandelt.

Alle Patienten, die Symptome einer OPC hatten, an der *C. dubliniensis* beteiligt war, waren HIV-infiziert. Bei den vier HIV-negativen Patienten konnte keine durch *C. dubliniensis* verursachte OPC beobachtet werden.

In verschiedenen Studien wurde vermutet, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem HI-Virus bzw. AIDS und dem Auftreten von Candidosen gibt. So konnten Hickman et al. (41) zeigen, dass Mutationen im HIV-Protease Gen wesentlich häufiger bei Patienten mit OPC als bei Patienten ohne OPC vorkommen. Eine weitere Studie beobachtete, dass *C. albicans* eine größere Adhärenz zu den Wangenschleimhautzellen einer HIV-positiven als zu denen einer HIV-negativen Person hatte. Das HI-Virus oder das geschwächte Immunsystem führen also möglicherweise zu Veränderungen in der Wirts-Mukosa, was sie empfindlich für *Candida*-Zellen macht (123). Im Vordergrund der Pathogenese von OPC bei HIV- bzw. AIDS-Patienten steht der Immundefekt und

nicht die Virulenz der Erreger (126). Die tragende Rolle spielt hierbei der T-Zell-Defekt (19), die Dysfunktion der neutrophilen Granulozyten als Bestandteil der zellulären Immunantwort spielen eine untergeordnete Rolle, da Komplement und Granulozyten im Speichel kaum vorhanden sind (95). Die zentrale Rolle der T-Zell-gebundenen Immunabwehr in der Pathogenese von Candidosen belegt z. B. eine Studie, in der gezeigt wurde, dass „Knockout-Mäuse“, denen bestimmte T-Zell-Rezeptoren fehlten, eine Resistenz gegen disseminierte Candidosen hatten (45). Des Weiteren könnten die *Candida*-Populationen selbst durch eine sich im Krankheitsverlauf entwickelnde Resistenz gegen die im Speichel vorhandenen Abwehrmechanismen, wie z. B. Lysozym, für eine erhöhte Prävalenz von *Candida*-Infektionen verantwortlich sein (100). Dass AIDS-Patienten als Primärprophylaxe oder zur Behandlung von rezidivierenden OPC häufig mit Fluconazol behandelt werden und gezeigt wurde, dass *C. dubliniensis* nach Fluconazol-Exposition eine stabile Resistenz gegen dieses Medikament entwickeln kann (73), könnte ebenfalls eine Ursache für das erhöhte Risiko für das Vorkommen von *C. dubliniensis* als prädominante Spezies in der Mundhöhle bei HIV-Patienten sein (42,73).

Die pathologische Konzentration von *Candida Sp.* in der Mundhöhle wurde bisher bei $\geq 10^4$ KBE/ml angenommen, während weniger als 100 KBE/ml als normale Kolonisierung betrachtet wurden (76). In der vorliegenden Arbeit lag die mittlere Keimzahl von *C. dubliniensis* bei dem Auftreten einer OPC ebenfalls bei 10^4 KBE/ml. In 44 % wurde eine *C. dubliniensis*-bedingte OPC in „physiologischer Keimzahl“ hervorgerufen. In einem Fall (Probe 26-4) wurde eine durch *C. dubliniensis* verursachte OPC sogar bei einer Keimzahl von nur 100 KBE/ml beobachtet. Die CD4-Zahl war zu diesem Zeitpunkt mit 239/ μ l noch ausreichend, die Viruslast war bis dato noch nicht bestimmt worden. Hier ist also wahrscheinlich, dass das Auftreten der OPC eher mit der Virulenz des Keims oder dem lokalen, als mit dem systemischen Immundefekt des Patienten zu tun hatte. Die pathologische Konzentration von *C. dubliniensis* scheint somit bei 10^4 KBE/ml zu liegen. Allerdings scheint *C. dubliniensis* unter bestimmten, nicht geklärten Umständen, auch Infektionen in wesentlich geringerer Konzentration hervorrufen zu können.

Oropharyngeale Candidose mit Nachweis von *C. dubliniensis* und HI-Viruslast

Der Mittelwert der Viruslast, bei der *C. dubliniensis* eine OPC verursacht hatte, betrug etwa 125.000 Kopien/ml. Die Viruslast, ab der mit Candidosen zu rechnen ist, liegt bei 36.000 Kopien/ml (25). Für *C. dubliniensis* scheint dieser Richtwert höher zu liegen. Es

ist vorstellbar, dass aufgrund der geringeren Pathogenität von *C. dubliniensis* eine höhere HI-Viruslast bzw. eine stärkere Immunsuppression erforderlich ist, um anfällig für eine *C. dubliniensis*-Infektion zu sein. Beweise hierfür gibt es bislang nicht.

Oropharyngeale Candidose mit Nachweis von *C. dubliniensis* und Immunstatus

Der Mittelwert der CD4-Zellzahl, bei dem in dieser Arbeit eine OPC auftrat, lag bei 208/µl. Man geht davon aus, dass das Immunsystem bei einer CD4-Zellzahl von unter 200/µl so weit geschwächt ist, dass mit dem Auftreten von *Candida*-Infektionen gerechnet werden muss (56). Dieser Richtwert scheint also auch für Infektionen mit *C. dubliniensis* zu gelten.

Oropharyngeale Candidose mit Nachweis von *C. dubliniensis* und Behandlung mit Proteaseinhibitoren

Die HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy), auch cART („combined Anti-Retroviral Therapy“) genannt, bezeichnet eine 1996 eingeführte Kombinationstherapie für die Behandlung von HIV bzw. AIDS. Sie besteht aus mindestens drei verschiedenen antiretroviralen Substanzen, wovon eine ein Proteaseinhibitor (PI) sein muss. Für *C. albicans* konnte gezeigt werden, dass PI nicht nur hemmend auf die retrovirale Protease, sondern auch hemmend auf *Candida* Proteasen wirken (52). Diese Medikamentengruppe gilt somit als protektiv gegen *C. albicans* Infektionen bei HIV-infizierten bzw. AIDS-kranken Patienten. Seit Beginn der HAART-Ära konnte ein Absinken der der OPC bei HIV-Infizierten von 30 % auf 4 % verzeichnet werden (61).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Auftreten von durch *C. dubliniensis* verursachte OPC bei Patienten, die mit PI behandelt wurden, und solchen, die nicht mit PI behandelt wurden, festgestellt werden. Die Hypothese, dass PI eine protektive Wirkung gegen das Auftreten von manifesten OPC bei Kolonisierung von *C. dubliniensis* in der Mundhöhle haben, kann also nicht bestätigt werden. Es lässt sich lediglich sagen, dass PI das Auftreten von *C. dubliniensis*-Infektionen nicht verhindern können. Eine interessante Fragestellung wäre, ob PI protektiv gegen eine Kolonisierung von *C. dubliniensis* in der Mundhöhle wirken, was anhand dieser Daten nicht beurteilt werden kann, weil die Besiedlung bzw. die Infektion mit *C. dubliniensis* das Einschlusskriterium in diese Studie war.

5.3 Genotypisierung von *C. dubliniensis* mit der Sonde Cd25

5.3.1 Genotypische Variabilität in der Gesamtheit der Klone

In den bisherigen epidemiologischen Studien mit *C. dubliniensis* (4,30,44) wurden *C. dubliniensis*-Stämme mittels Hybridisierung mit der Sonde Cd25 in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt (Cd25 Gruppe I, II und III).

Joly et al. (44) typisierten 57 unabhängige *C. dubliniensis*-Isolate aus elf verschiedenen Ländern mit Cd25 und konnten sie an einem Knotenpunkt von $S_{AB (Dice)} = 0,24$ in zwei unterschiedliche Gruppen unterteilen. Zu Cd25 Gruppe I gehörten 86 % der Isolate, welche untereinander sehr eng verwandt waren (mittlerer $S_{AB (Dice)} = 0,8$). Cd25 Gruppe II mit den restlichen 14 % der Isolate war in sich inhomogener mit einem mittleren $S_{AB (Dice)} = 0,47$. Die Isolate in Cd25 Gruppe I stammten aus Belgien, Großbritannien, Australien, Deutschland und der Schweiz. Die Isolate der Cd25 Gruppe II stammten hauptsächlich aus Großbritannien, ein Isolat aus Spanien und eins aus den Niederlanden.

2002 haben Gee et al. (30) eine Sammlung von 98 Isolaten von 94 Patienten aus 15 Ländern mit Cd25 untersucht. Die Einteilung von Joly et al. (44) in Cd25 Gruppe I und II konnte bestätigt werden, der Knotenpunkt der Trennung der beiden Gruppen lag hier bei $S_{AB (Dice)} = 0,19$. 68 % der Cd25 Gruppe I-Isolate stammten von HIV-positiven und 70 % der Cd25 Gruppe II-Isolate von HIV-negativen Patienten. Die Cd25 Gruppe I-Isolate stammten aus Nordamerika, Südamerika, Europa und Israel, während die Cd25 Gruppe II-Isolate aus Kanada, Irland, Israel und England stammten. Es wurde mittels Nukleotidsequenzanalyse untersucht, ob die Gruppierungen des „Cd25-fingerprints“ spezifischen Genotypen entsprachen. Dabei ergaben sich vier unterschiedliche Sequenztypen, entsprechend Genotyp 1 bis 4. Der am häufigsten vorkommende Genotyp 1 gehörte zu Cd25 Gruppe I, Genotyp 2, 3 und 4 gehörten zu Cd25 Gruppe II. Moran et al. (72) haben 2002 die enge Verwandtschaft unter den Cd25 Gruppe I-Isolaten bestätigt. 58 % der von ihm getesteten *C. dubliniensis*-Isolate der Gruppe I hatten eine bestimmte Genmutation, die bei den Gruppe II-Isolaten nicht nachweisbar waren. Das lässt vermuten, dass viele dieser Gruppe I-Isolate ursprünglich ein Isotyp waren.

2005 haben Al Mosaid et al. (4) anhand des „Cd25-fingerprints“ eine dritte Gruppe von *C. dubliniensis*-Isolaten entdeckt. Es wurden 30 *C. dubliniensis*-Isolate aus Saudi Arabien und Ägypten und 16 Isolate aus Israel genotypisiert. Dann wurden „fingerprints“ mit Cd25 generiert und die von Gee et al. (30) beschriebene Nukleotidsequenzanalyse durchgeführt. Die Hybridisierung mit Cd25 ergab im Dendrogramm zwei Hauptgruppen, wobei Cd25 Gruppe I dem Genotyp 1 und Cd25 Gruppe II dem Genotyp 3 und 4 entsprachen. In einem Dendrogramm, das zusammen aus den von Al Mosaid et al. (4) untersuchten Isolaten, sowie denen von Gee et al. (30) erstellt wurde, ergaben sich drei Cd25 Hauptpopulationen. Die ersten beiden Gruppen entsprachen den vorher beschriebenen Cd25 Gruppen I und II (Knotenpunkt $S_{AB (Dice)} = 0,13$). Die dritte Gruppe wurde vorher nicht beschrieben und bestand aus den saudiarabischen und ägyptischen Isolaten, die vorher mittels Nukleotidsequenzanalyse als Genotyp 3 und 4 identifiziert und Gruppe II zugeordnet wurden. Der Genotypen 3 und 4 kamen also Cd25-Gruppen-übergreifend in Gruppe II und III vor. Auffällig war, dass alle saudiarabischen Cd25 Gruppe III-Isolate resistent gegen das Antimykotikum 5-Flucytosin (5FC) waren. Alle Cd25 Gruppe I- und II-Isolate waren empfindlich für 5FC. Das legt die Vermutung nahe, dass Cd25 Gruppe III-Isolate dominant in arabisch ethnischen Gruppen sind.

Eine ähnliche Beobachtung wurde 2003 in Südafrika von Blignaut et al. (12) gemacht. Es wurde vermutet, dass die Kolonisierung mit *C. dubliniensis* stärker von ethnischer Rasse als vom HIV-Status abhängt. So wurde in der gesunden weißen Bevölkerung eine Prävalenz von *C. dubliniensis* von 14 % festgestellt, unter den weißen HIV-infizierten waren es nur 9 %. Hingegen wurde *C. dubliniensis* gar nicht in der gesunden schwarzen Bevölkerung und nur zu 1,5 % in der HIV-infizierten schwarzen Bevölkerung isoliert.

Auch für *C. albicans* konnte gezeigt werden, dass die sich Verteilung des Genotyps unter den ethnischen Gruppen der Araber und der Drusen grundlegend von dem der restlichen Weltbevölkerung unterscheidet (62).

Die mittlere Distanz unter allen von mir gefundenen Klonen betrug $\bar{d}_{(Eu)} = 1,68 \pm 0,51$ ($S_{AB (Dice)} = 0,88$). Das bedeutet, dass die untersuchten Isolate insgesamt ein sehr enges Verwandtschaftsverhältnis untereinander hatten und eine geringe genetische Variabilität zwischen den Isolaten bestand. Die Klone ließen sich an einem Knotenpunkt von $d_{(Eu)} = 2,78$ ($S_{AB (Dice)} = 0,72$) in zwei Gruppen teilen. Die jeweilige mittlere Distanz in den

Gruppen I und II war ähnlich gering ($\bar{d}_{(Eu) I} = 1,68 \pm 0,49$ bzw. $\bar{d}_{(Eu) II} = 1,53 \pm 0,52$) wie die mittlere Distanz in der Gesamtheit der Klone. Der Unterschied zwischen der mittleren Distanz der Klone der Gruppe I und der Gruppe II war statistisch nicht signifikant ($p = 0,44$). Der Knotenpunkt, an dem sich die beiden Hauptgruppen voneinander trennten ($d_{(Eu)} = 2,78$, entsprechend $S_{AB (Dice)} = 0,72$), lag im Bereich der mäßigen Verwandtschaft, während in den bisherigen Studien (4,30,44) der Knotenpunkt, an dem sich Cd25 Gruppe I von Cd25 Gruppe II trennte, bei $S_{AB (Dice)}$ -Werten zwischen 0,13 bis 0,24 lag, entsprechend keinem relevanten Verwandtschaftsgrad. Alles spricht dafür, dass alle Klone dieser Arbeit wahrscheinlich zu der bisher beschriebenen Cd25-Gruppe I gehörten (4,30,44). Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass 91 % (53/58) der von mir untersuchten Klone von HIV-infizierten Patienten stammten, was als charakteristisch für Cd25 Gruppe I gilt (30). Des Weiteren bestand kein offensichtlicher klinischer oder phänotypischer Unterschied zwischen den von mir gebildeten Cd25 Gruppe I- und Gruppe II-Klonen. Die bisher aus Deutschland stammenden *C. dubliniensis*-Isolate, die in eine größere epidemiologische Studie mit der Sonde Cd25 eingegangen sind, gehörten ebenfalls zu Cd25 Gruppe I (30,44). Eine sichere Aussage über die Gruppenzugehörigkeit der von mir untersuchten Isolate kann letztendlich nur getroffen werden, wenn man eine gemeinsame Clusteranalyse mit den bisher veröffentlichten Isolaten durchführen würde.

Bei Cd25 Gruppe I könnte es sich entweder um eine jüngere und deshalb homogenere Subgruppe von *C. dubliniensis* handeln, oder die Cd25 Gruppe II Isolate könnten eine höhere Frequenz der Cd25-Sequenz-Reorganisation haben (44). Der Grund für die Dominanz von HIV-Klonen in Cd25 Gruppe I könnte darauf zurückgeführt werden, dass Cd25 Gruppe I-Isolate speziell an die Kolonisierung und das Überleben in der Mundhöhle adaptiert und durch die HIV-Pandemie überrepräsentiert sind (30).

Aussagen über Unterschiede der *C. dubliniensis*-Stämme in unterschiedlichen ethnischen Gruppen können anhand dieser Studie nicht gemacht werden, weil es keine Rassenunterschiede in der von mir untersuchten Patientenpopulation gab und alle Isolate aus Deutschland stammten.

Die Mehrzahl (95 %) der 58 unterschiedlichen hier gefundenen Klone trat individuell bei einem Patienten auf. Nur 5 % der Klone kamen bei jeweils zwei unterschiedlichen Patienten vor, zwischen denen es keine bekannte Verbindung gab. Die betroffenen Patienten waren HIV-infiziert und stellten sich unabhängig voneinander regelmäßig in

der HIV-Ambulanz der Klinik vor. Somit könnte es einerseits Zufall sein, dass bei zwei Patienten unabhängig voneinander der gleiche Klon entstanden ist. Andererseits könnten bestimmte *C. dubliniensis*-Stämme auch in der Lage sein, sich in einzelnen Kliniken bzw. Patientenpopulationen zu etablieren, so dass die Übertragung von einem Patienten auf den anderen in der Klinik stattgefunden haben könnte. Die Übertragung eines Klons bei den hier untersuchten Patienten ist bei nicht-zeitnahe Auftreten der gemeinsamen Klone und bei ausschließlich ambulanter Behandlung eher unwahrscheinlich, es sei denn, der etablierte Stamm differenziert sich mikroevolutionär in der Klinik weiter, und es kommt dann zur Übertragung der bereits leicht veränderten Klone (30).

In der epidemiologischen Studie von Gee et al. (30) ergab das „fingerprinting“ mit Cd25 sogar viele identische Bandenmuster bei unterschiedlichen Patienten, die zum Teil stationär in derselben Klinik behandelt wurden.

Hier konnte zwar ein Teilen von Klonen unter unabhängigen Individuen beobachtet werden, aber ein Austausch von genetisch identischen *C. dubliniensis*-Stämmen unter Sexualpartnern konnte nicht gezeigt werden. Allerdings gab es in dieser Patientenpopulation nur ein Paar, und in dem Zeitraum, in dem Probenentnahmen von beiden Partnern erfolgten, wurden nur eine Probe von Patient 14 und drei Proben von Patient 28 gewonnen. Ein genereller Austausch von *C. dubliniensis*-Isolaten zwischen AIDS-Patienten ist grundsätzlich denkbar, weil der Verwandtschaftsgrad der hier gefundenen Isolate insgesamt sehr hoch war. Bei *C. albicans* wurde in einigen Studien ein Austausch von oral gewonnenen (102) bzw. ein Austausch zwischen oral und vaginal gewonnenen Isolaten unter Sexualpartnern beobachtet (57,104,107). Insgesamt wurde derselbe *C. albicans*-Stamm jedoch selten von zwei Individuen geteilt (89,99).

5.3.2 Longitudinalverlauf bei einzelnen Patienten

In der Verlaufsbeobachtung der sequentiellen *C. dubliniensis*-Isolate, mit denen die Patienten kolonisiert oder infiziert waren, zeigten sich drei verschiedene Situationen:

1. Der gleiche Genotyp persistierte im Verlauf (29 %).
2. Es zeigten sich kleinere Veränderungen des Genotyps im Rahmen von enger Verwandtschaft. Diese Situation kam mit 62 % am häufigsten vor.

3. Genotypen wurden im Verlauf durch andere, nicht verwandte Genotypen ersetzt (9 %).

Bei den Patienten, die im Verlauf mit dem gleichen Genotyp kolonisiert waren, lagen höchstens vier Proben vor. Bei wenigen Proben ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass nur ein Genotyp auftritt, als bei vielen Proben. Deshalb könnte diese Situation hier überrepräsentiert sein. Das dominierende Szenario ist also eindeutig die Veränderung des Genotyps im Rahmen von enger Verwandtschaft. Bei allen Patienten lag die mittlere Distanz der Klone bei $\bar{d}_{(EU)} \leq 1$. Die sequentiellen Klone waren also so eng miteinander verwandt, dass die Veränderung des Genotyps in vielen Fällen im Rahmen von progressiver Mikroevolution (Schwellenwert $d_{(EU)} \leq 1,41$) stattgefunden haben könnte. Das heißt, dass die unterschiedlichen Klone aus dem zuerst aufgetretenen Klon entstanden sind. Das traf z. B. bei Patient 6 zu. Bei einem Unterschied von nur einer Bande im „Cd25-fingerprint“ ($d_{(EU)} = 1$, entspricht $S_{AB (Dice)} = 0,95$) war eine Mikroevolution von Klon 3a zu Klon 3b wahrscheinlich. Bei den Patienten 11, 21, 26 und 38 ist auch von einer mikroevolutionären Veränderung der Klone auszugehen. Ebenso könnten die kleinen Varianten Folge eines stetigen Rearrangements im *C. dubliniensis*-Genom sein.

Das gleiche Phänomen wurde schon im Zusammenhang mit sequentiellen *C. albicans*-Isolaten im Verlauf der AIDS-Progression beschrieben (103). Allerdings wurde gezeigt, dass die meisten HIV-infizierten Individuen im Verlauf ihrer Erkrankung mit einem einzigen *C. albicans*-Stamm infiziert bzw. kolonisiert waren (10,57,69,102,103,126). Dieser Stamm war charakteristisch für das jeweilige Individuum und konnte unabhängig von Symptomatik, antimykotischer Therapie und Resistenzentwicklung persistieren (10,14,67,110).

In den letzten beiden Szenarien konnte ich bei *C. dubliniensis* auch ein Abwechseln zwischen zwei oder mehreren Genotypen beobachten. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass gleichzeitig mehr als ein *C. dubliniensis*-Genotyp vorlag, aber weil pro Rachenspülwasser-Kultur nur eine Hefekolonie in die weiteren Untersuchungen eingegangen ist, zufällig nur einer dieser Genotypen ausgewählt worden ist. Denkbar wäre somit, dass gleichzeitig unterschiedliche Genotypen vorliegen, die sich im Verlauf nicht verändern. Zur Testung dieser Hypothese wurden bei Patient 27 exemplarisch aus den Kulturen von drei verschiedenen Rachenspülwasser-Proben je mehrere Kolonien

entnommen und mit Cd25 genotypisiert. Der Patient war bei allen drei Probenentnahmen simultan mit mehr als einem *C. dubliniensis*-Genotyp kolonisiert. Es konnte beobachtet werden, dass nicht nur mikroevolutionär verbundene Genotypen gleichzeitig vorkamen (Klone 5k/5l und Klone 1b/1c), sondern auch „nur“ eng miteinander verwandte Genotypen (Klon 5k und Klon 1b) mit einer Distanz von $d_{(EU)} = 2,23$ ($S_{AB (Dice)} = 0,80$). In letztem Fall fand also wahrscheinlich eine Neuinfektion statt, bei der der alte Klon weiterhin persistierte.

Möglicherweise wurde die gleichzeitige Kolonisierung von unterschiedlichen *C. dubliniensis*-Klonen durch den HIV-bedingten Immundefekt prädisponiert (14). Die mittlere CD4-Zahl war bei diesem Patienten mit $365/\mu\text{l}$ noch nicht unter dem kritischen Wert, genauso wenig wie eine kritisch erhöhte Viruslast mit durchschnittlich 800 Kopien/ml vorlag. Eine wichtigere Rolle scheint hier eher der lokale Immundefekt in der Mundhöhle als der systemische Immundefekt gespielt zu haben.

Lockhart et al. (57) und Boerlin et al. (14) vermuteten bei *C. albicans*-verursachter Vaginitis, dass die Unterstämme eines etablierten infektiösen Stammes in sequenziellen Infektionen gemischt werden. Dieses Phänomen ist in der Literatur als „genetic shuffling“ (genetisches Vermischen oder genetische Umbesetzung) beschrieben und könnte auch eine Ursache für das sequentielle Abwechseln von verschiedenen Klonen bei einem Patienten sein. Samaranayake et al. (99) vermuteten, dass es durch das vermehrt auftretende genetische „shuffling“ von *Candida Sp.* bei AIDS-Patienten zu dem gehäuften Auftreten von Candidosen bei diesen Patienten kommt. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass es zu endogenen Reinfektionen mit einem identischen Klon von anderen Körperstellen (z. B. Haut, Vagina) oder zu exogenen Infektionen von Sexualpartnern kommt (99,103). In einem Dendrogramm, in dem hier die Klone der Partner Patient 14 und Patient 28 aus dem gleichen Zeitraum aufgetragen wurden, ergab sich eine durchschnittliche Distanz von $\bar{d}_{(Eu)} = 1,43$, was keinen Hinweis auf eine stattgehabte Mikroevolution darstellte. In dieser Arbeit konnte also kein engeres Verwandtschaftsverhältnis unter den Klonen der Sexualpartner als unter der Gesamtheit der Klone festgestellt werden.

Die Vielfalt der *C. dubliniensis*-Subtypen bei einem Patienten könnte auch durch die Akquisition eines resistenteren Subtyps von einer exogenen Quelle oder durch die Selektion einer resistenten Subpopulation aus einer ursprünglich gemischten Infektion bedingt sein. Nach Schröppel et al. (107) wird durch die Behandlung mit Antimykotika

entweder eine Selektion von Varianten des ehemals infizierenden Keims oder ein Ersatz durch einen genetisch nicht verwandten Stamm verursacht. Die fehlgeschlagene Eradikation eines *C. dubliniensis*-Stammes durch Antimykotika könnte nicht nur zur Resistenzentwicklung führen (10), sondern auch das Persistieren eines Stammes in der Mundhöhle bedingen (14). In anderen Fällen, in denen die vollständige Eradikation Erfolg hatte, wäre somit die Voraussetzung für die Kolonisierung mit einem neuen Keim geschaffen. Von Moran et al. (73) wurde vermutet, dass eine durch Fluconazol-Therapie induzierte Mikroevolution (ein Patient ist gleichzeitig mit unterschiedlichen Stämmen kolonisiert, die sich in progressiver Mikroevolution befinden) eine Generation von veränderten Genotypen entstehen könnte, von denen einige einen selektiven Vorteil unter schnellen Veränderungen der Umweltbedingungen haben könnten. Diese Beobachtung könnte Folgen für die medikamentöse Behandlung von *C. dubliniensis* verursachten Candidosen haben, weil eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Antimykotika denkbar wäre. Für *C. albicans* konnte ein simultanes Vorkommen von mehreren Klonen, die unterschiedlich sensibel für Fluconazol waren, gezeigt werden (14). Diese mikroevolutionären Klon-Veränderungen könnten Konsequenzen für die Klinik haben. So ging bei Patient 33 das Auftreten einer OPC eindeutig simultan mit der mikroevolutionären Veränderung des Genotyps (von Klon 2n zu 2y und danach wieder zu 2n) einher ($d_{(Eu)} = 1$, entsprechend $S_{AB (Dice)} = 0,95$), der möglicherweise virulenter war als der eigentliche Klon. Eine Resistenz entwickelte sich nicht.

Von Martinez et al. (60) wurde nicht nur eine Veränderung des Genotyps einer Spezies unter Fluconazol-Therapie beobachtet, sondern auch ein Wechsel der Spezies. In einer Longitudinalstudie einer Gruppe von HIV-infizierten Patienten, die initial mit einem für Fluconazol sensitiven *C. albicans*-Stamm infiziert waren, war bei 27 % der Patienten der *C. albicans*-Stamm nicht in der Lage, eine Resistenz gegen Fluconazol auszubilden, und es zeigte sich ein Wechsel von *C. albicans* zu *C. dubliniensis*.

Verlässliche Aussagen über Mikroevolution innerhalb einer Spezies sind nur bedingt zulässig. Algorithmen zur Berechnung von Similaritätskoeffizienten (wie z. B. Dice) wurden entwickelt, um phylogenetische Bäume auf Spezies-Niveau und nicht auf Subspezies-Niveau zu generieren (109). Zum anderen stellten Joly et al. (44) im direkten Vergleich fest, dass Mikroevolution *in vivo* besser mit den DNS-Sonden Cd1 und Cd24 untersuchbar ist.

5.3.3 Genotypische Variabilität bei HIV-positiven im Vergleich zu HIV-negativen Patienten

Die *C. dubliniensis*-Klone der HIV-positiven Patienten waren genetisch etwas näher miteinander verwandt als die *C. dubliniensis*-Klone der HIV-negativen Individuen, was an der niedrigeren mittleren Distanz unter den Klonen erkennbar war ($\bar{d}_{(Eu)} = 1,71$ vs. $\bar{d}_{(Eu)} = 2,02$). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,001$). Bei den HIV-positiven Patienten bildeten 98 % der Klone enge Cluster, bei den HIV-negativen Patienten waren es nur 80 %. Dass sich bei den Klonen der HIV-negativen Patienten als einzige der hier vergleichend untersuchten Gruppen auch lose Cluster bildeten, während die Klone der HIV-positiven Patienten ausschließlich eng verwandte Cluster bildeten, zeigt ebenfalls an, dass Erstere genetisch verschiedenartiger waren. In beiden Gruppen lagen die mittleren Distanzen der Klone jedoch noch im Bereich von engem Verwandtschaftsgrad. Die mittlere Distanz der Gesamtheit der Klone lag ebenfalls in diesem Bereich ($\bar{d}_{(Eu)} = 1,68$).

Auch wenn die genetische Diversität von *C. dubliniensis*-Klonen von HIV-Patienten im Vergleich zu denen von HIV-negativen Individuen reduziert war, bildeten die HIV-Klone keine eigene genetische Gruppe. Sie kamen im gemischten Dendrogramm der HIV-positiven und HIV-negativen Klone zwar nur in der von mir gebildeten Cd25 Gruppe I vor, aber da es sich bei den durch mich untersuchten Cd25 Gruppen I und II wahrscheinlich um Untergruppen der publizierten Cd25 Gruppe I handelt (4,30,44), ist nicht von einer eigenen genetischen Gruppierung auszugehen. Schmid et al. (103) kamen in Hinblick auf *C. albicans* bei HIV-positiven und HIV-negativen Patienten zu dem gleichen Ergebnis.

Die Tatsache, dass die *C. dubliniensis*-Isolate der HIV-Patienten keine eigene genetische Gruppe bilden, könnte implizieren, dass sie keinen direkten Selektionsvorteil bei AIDS-Patienten haben, sondern nur besser an die Mundhöhle bei oraler und systemischer Abwehrschwäche angepasst sind (111).

In Studien mit *C. albicans* wurde gezeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den aus der Mundhöhle stammenden *C. albicans*-Isolaten von AIDS-kranken und denen gesunder Patienten gibt (14,126).

5.3.4 Genotypische Variabilität bei Patienten mit hoher im Vergleich zu Patienten mit niedriger Viruslast

Die Klone von den Patienten mit niedriger Viruslast (< 36.000 Kopien/ml) waren in sich etwas inhomogener als die der Patienten mit hoher Viruslast (≥ 36.000 Kopien/ml), weil sie eine etwas höhere Distanz zueinander hatten ($\bar{d}_{(Eu)} = 1,71$ vs. $\bar{d}_{(Eu)} = 1,65$). Dieser Distanzunterschied war allerdings statistisch nicht signifikant ($p = 0,756$). Alle Klone der Patienten mit hoher Viruslast ordneten sich in engen Clustern an und bildeten insgesamt halb so viele eng verwandte Cluster aus, wie die Klone der Patienten mit niedriger Viruslast, die zu 96 % (25/26) enge Cluster ausbildeten. Die mittleren euklidischen Distanzen der beiden Gruppen lagen in einem $S_{AB (Dice)}$ -Bereich 0,87 bzw. 0,88. Zusammenfassend ist nicht von einem relevanten genetischen Unterschied zwischen den *C. dubliniensis*-Klonen von Patienten mit einer Viruslast von unter 36.000 Kopien/ml und denen mit einer Viruslast von über 36.000 Kopien/ml auszugehen.

5.3.5 Genotypische Variabilität bei Patienten mit niedriger im Vergleich zu Patienten mit hoher CD4-Zahl

Die Klone von den Patienten mit niedriger CD4-Zahl ($\leq 200/\mu\text{l}$) waren in sich inhomogener als die von den Patienten mit hoher CD4-Zahl ($> 200/\mu\text{l}$), weil sie eine höhere Distanz zueinander hatten ($\bar{d}_{(Eu)} = 1,82$, entsprechend $S_{AB (Dice)} = 0,86$ vs. $\bar{d}_{(Eu)} = 1,68$, entsprechend $S_{AB (Dice)} = 0,88$). Dieser Unterschied erwies sich nicht als statistisch signifikant ($p = 0,415$). Beide Gruppen bildeten gleich viele eng verwandte Cluster aus, und in beiden Gruppen wurden alle Klone engen Clustern zugeordnet, was auf eine enge Verwandtschaft in beiden Gruppen hindeutet. Also ist auch nicht von einem genetischen Unterschied zwischen den *C. dubliniensis*-Klonen von Patienten mit kritischem Immunstatus und den Klonen von Patienten mit ausreichendem Immunstatus auszugehen.

5.3.6 Genotypische Variabilität von Patienten mit im Vergleich zu Patienten ohne OPC

14 % (8/58) der unterschiedlichen Klone waren mit Symptomen einer OPC assoziiert. 25 % (2/8) der Genotypen, die im Zusammenhang mit einer OPC isoliert wurden (Klon 2q und 2y), traten nie ohne Symptome einer OPC auf. Die Mehrzahl der Klone (75 %) traten aber mindestens an einem anderen Zeitpunkt auf, an dem keine Symptome einer OPC vorlagen, zum Teil sogar bevor und nachdem sie eine OPC verursacht hatten. Es scheinen also keine spezifischen Genotypen für die Ausbildung von Symptomen verantwortlich zu sein. Eine durch *C. dubliniensis* verursachte OPC scheint dann eher auf den lokalen oder systemischen Immundefekt von HIV-Infizierten als auf das Auftreten eines speziell virulenten *C. dubliniensis*-Stammes zurückführen zu sein. Diese Vermutung wurde bereits im Zusammenhang mit *C. albicans* geäußert (126). Ebenso konnte kein genetischer Unterschied zwischen kommensalen und pathogenen vaginal (104) oder oral gewonnenen (14,89) *C. albicans*-Isolaten festgestellt werden.

Die mittlere Distanz unter den Klonen der asymptomatischen Patienten war signifikant ($p = 0,038$) niedriger als die unter den Klonen der symptomatischen Patienten ($\bar{d}_{(Eu)} = 1,67$, entsprechend $S_{AB(Dice)} = 0,88$ vs. $\bar{d}_{(Eu)} = 2,10$, entsprechend $S_{AB(Dice)} = 0,82$). 98 % der Klone von den Patienten ohne Symptomatik ordneten sich in sieben eng verwandten Clustern ein, während es bei den Klonen mit Symptomatik nur 75 % der Klone waren, die sich in zwei eng verwandten Clustern formierten. Außerdem hatten die Patienten, die unter einer OPC litten ($n = 15$), an der *C. dubliniensis* beteiligt war, im Schnitt 2,6 unterschiedliche Klone. Die Patienten, die keine durch *C. dubliniensis* verursachten Symptome hatten ($n = 11$), hatten im Schnitt 1,6 unterschiedliche Klone.

Alle drei Aspekte implizieren, dass die Klone, bei deren Isolation keine OPC vorlag, in sich homogener waren, als die Klone, die im Zusammenhang mit einer OPC auftraten. Samaranayke et al. (99) zeigten im Gegensatz dazu für *C. albicans*, dass die Isolate der asymptomatischen Patienten eine größere genetische Diversität als die der symptomatischen Patienten zeigten. Es konnte nicht gezeigt werden, dass die infektiösen *C. albicans*-Isolate eine eigene genetische Gruppierung repräsentieren.

Dass in dieser Arbeit in den Vergleichsgruppen Viruslast und Immunstatus keine relevanten Unterschiede gezeigt werden konnten und dass die Klone der symptomatischen und HIV- negativen Patienten zwar Unterschiede zu den

Vergleichsgruppen zeigten, aber keine eigene Gruppierung darstellten, könnte einerseits daran liegen, dass das „Cd25-fingerprint-Profil“ nicht ausreichend ist, um alle *C. dubliniensis*-Stämme eindeutig voneinander zu unterscheiden. Die gleiche Vermutung hatten Gee et al. (30), weil der mittels „Cd25-fingerprint-Profil“ vermutete hohe Verwandtschaftsgrad unter den untersuchten *C. dubliniensis*-Stämmen nur zum Teil in der Karyotypanalyse bestätigt werden konnte. Andererseits könnte es tatsächlich keine genetischen Subpopulationen von *C. dubliniensis* geben, die bevorzugt bei Patienten mit HIV-Infektion und insbesondere bei hoher Viruslast und schlechtem Immunstatus auftreten. Auch die infektiösen *C. dubliniensis*-Stämme würden dann im Vergleich zu den kommensalen Stämmen keine gesonderte genetische Subpopulation darstellen. Die größere genetische Diversität unter den *C. dubliniensis*-Klonen der HIV-negativen und der symptomatischen Patienten im Vergleich zu der entsprechenden Bezugsgruppe könnte jeweils auf unterschiedliche evolutionäre genetische Trends von *C. dubliniensis* in diesen Gruppen hinweisen. Diese unterschiedlichen Entwicklungen könnten bisher noch keine Konsequenz für die Ausbildung von genetischen Subpopulationen gehabt haben, was aber bei weiterer auseinander driftender genetischer Entwicklung in Zukunft durchaus möglich sein könnte. Diese These wird dadurch unterstützt, dass es sich bei *C. dubliniensis* um eine relativ junge Spezies handelt, in der noch keine grundlegenden evolutionären Veränderungen stattgefunden haben.

5.3.7 Genotypische Variabilität unter Resistenzentwicklung

C. dubliniensis ist sensibel für Fluconazol (51,73) und andere gängige Antimykotika, wie z. B. Itraconazol, Amphotericin B und Voriconazol (87,88). In der hier untersuchten Patientengruppe waren 9 % (17/194) der getesteten *C. dubliniensis*-Isolate resistent gegen Itraconazol oder Fluconazol. Auffällig war, dass nur eins der 194 resistenten Isolate (0,5 %) resistent gegen Fluconazol, aber 16 Isolate (8 %) resistent gegen Itraconazol waren. Fluconazol-Resistenz von *C. dubliniensis in vivo* ist eher selten (73,84,96). Es wurden aber auch *C. dubliniensis*-Populationen untersucht, in denen das Vorkommen von Fluconazol-resistenten Stämmen relativ häufig (19 %) vorkam (38). Die untersuchte Probenzahl war mit $n = 16$ jedoch gering, weshalb dieser hohe Prozentsatz möglicherweise nicht repräsentativ ist. Die Resistenz gegen Itraconazol

wurde in dieser Arbeit bei 12 % der Isolate auch ohne vorausgehenden antimykotischen Selektionsdruck beobachtet, was die These unterstützt, dass *C. dubliniensis* zu den für gängige Antimykotika weniger empfindlichen *Candida Sp.* gehört (21,79,79,93). Das gehäufte Auftreten von Itraconazol-resistenten *C. dubliniensis*-Stämmen wurde bisher nicht beschrieben.

Die Patienten mit den resistenten *C. dubliniensis*-Isolaten wurden häufiger mit Antimykotika vorbehandelt als die mit den sensiblen Isolaten (88 % vs. 68 %), wobei sich die Signifikanz dieses Unterschiedes wegen der geringen Fallzahl von resistenten *C. dubliniensis*-Isolaten im Verhältnis zu den sensiblen statistisch nicht berechnen ließ (16 resistente vs. 167 sensible Isolate). Dennoch könnten diese *in vivo* Ergebnisse die Ergebnisse von Moran et al. (73) unterstützen, die gezeigt haben, dass *C. dubliniensis* nach Fluconazol-Exposition *in vitro* eine stabile Resistenz gegen dieses Medikament entwickeln kann. Die Mehrzahl der *C. dubliniensis*-Isolate blieb trotz Fluconazol-Exposition für diese Substanz als auch für Itraconazol sensibel. Keiner der gegen Itraconazol resistenten Patienten wurde mit Itraconazol vorbehandelt. Patientin 16 war die Einzige in der Untersuchungsgruppe, die überhaupt mit Itraconazol behandelt wurde. Bei ihr trat jedoch keine Itraconazol-Resistenz auf. Es besteht offenbar eine Kreuzresistenz zwischen Fluconazol und Itraconazol.

Die Tatsache, dass sich unter Resistenzentwicklung gegen Antimykotika nur in drei von 14 Fällen ein Zusammenhang mit dem „fingerprint-Muster“ mit Cd25 herstellen ließ, könnte einerseits implizieren, dass eine Resistenz ohne genetische Veränderungen des Stammes einhergeht. Andererseits ist die molekulare Typisierungsmethode mit Cd25 möglicherweise inadäquat, um genetische Veränderungen, die bei der Akquisition einer Resistenz gegen Itraconazol oder Fluconazol entstehen, zu detektieren.

Gee et al. (30) haben *in vivo* mehrere Populationen von *C. dubliniensis* aus einer Patientenprobe mit Cd1, Cd24 und Cd25, sowie der Karyotypanalyse untersucht und konnten bei reduzierter Fluconazol-Sensibilität nur mit den Sonden Cd1 und Cd24 signifikante genetische Variationen oder Mikroevolution beobachten. Meine Ergebnisse zeigen in 3 von 14 Fällen (21 %) Variabilitäten des *C. dubliniensis*-Genotyps bei reduzierter Itraconazol-Sensibilität *in vivo* mit der Sonde Cd25.

Zur Klärung der *in vitro* Mikroevolution unter Fluconazol-Exposition haben Gee et al. (30) *C. dubliniensis*-Isolate steigenden Konzentrationen Fluconazol ausgesetzt und anschließend sowohl karyotypisiert als auch mit Cd1, Cd24 und Cd25 hybridisiert. Bei zunehmender Fluconazol-Resistenz konnten auch hier keine Variationen der Cd25-

Muster beobachtet werden. Unter Fluconazol-Exposition wurde eine steigende Variabilität im Karyotyp-Muster festgestellt, was aber nicht mit einer Resistenzentwicklung einherging.

Für *C. albicans* konnte gezeigt werden, dass die Selektion eines resistenten Stammes unter Fluconazol-Therapie nicht selten war (69,89,96). Es ist auch publiziert, dass *C. albicans* und *C. dubliniensis* eine simultane Resistenz gegen Fluconazol ausbilden können (96). Auch bei den von mir untersuchten Isolate konnte eine simultane Resistenz von *C. albicans* und *C. dubliniensis* gegen Antimykotika bei 13 % (4/30) der Patienten (Patientin 10, Patient 14, 21 und 38) beobachtet werden.

Bei den resistent werdenden *C. albicans*-Stämmen wurde sowohl ein Persistieren des Genotyps, als auch ein Übergang zu einem anderen Genotyp beobachtet (10,14,67,69,102). Dem Persistieren eines Klons im Krankheitsverlauf könnte eine fehlgeschlagene Eradikation des infizierenden Agens durch Antimykotika zugrunde liegen und zur Entwicklung eines resistenten Klons führen (10).

6 Zusammenfassung

6.1 Methoden

Die besten unter den von mir getesteten kulturellen Methoden zur Identifizierung von *C. dubliniensis* bzw. zur Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* für ein Routinelabor sind die Kultivierung der Isolate auf *Cryptococcus*-Agar nach Staib, der Wachstumstest bei 45 °C und die Biotypisierung mit dem API® ID 32 C. Der einzige kulturelle Test, der nicht signifikant schlechter war als die molekulare Referenzmethode AP-PCR, war die Kultivierung auf Staibagar. Die Differenzierung von *C. albicans* und *C. dubliniensis* sollte immer bei 45 °C und nicht bei 42 °C erfolgen. Um eine ausreichende Testgenauigkeit zu erreichen, sollten immer mehrere kulturelle Methoden miteinander kombiniert werden. Zwei der 212 untersuchten *C. dubliniensis*-Isolate hatten *C. dubliniensis*-typische API®-Codes, die bisher nicht publiziert wurden (7042.1000.15 und 7142.1400.11). Die Assimilation der Kohlenhydrate Trehalose, Methyl- α D-Glukopyranosid und Xylose eignen sich am Besten für die Differenzierung zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans*. Laktat ist zu diesem Zweck nicht geeignet. *C. dubliniensis* kann in einigen Fällen Methyl- α D-Glukopyranosid und Xylose assimilieren.

6.2 Klinische Bedeutung von *C. dubliniensis*

C. dubliniensis hat zu einem sehr geringen Prozentsatz das Potential, oropharyngeale Infektionen der Mundhöhle bei HIV-Patienten hervorzurufen. Die Kolonisierung mit *C. dubliniensis* wurde nur bei HIV-Patienten klinisch relevant und verursachte oropharyngeale Candidosen (OPC). In allen Fällen waren die Patienten entweder prophylaktisch oder therapeutisch mit Fluconazol vorbehandelt worden. *C. dubliniensis* wurde in dieser Patientenpopulation am häufigsten in Mischkultur zusammen mit *C. glabrata* und nicht mit *C. albicans* isoliert.

Eine durch *C. dubliniensis* verursachte OPC wurde bei einer durchschnittlichen Keimzahl von 10^4 KBE/ml verursacht, was der in der Literatur beschriebenen pathologischen Konzentration von *C. albicans* entspricht. Allerdings konnte auch

beobachtet werden, dass *C. dubliniensis* eine OPC in einer deutlich geringeren Konzentration (10^2 KBE/ml) bei HIV-Infizierten hervorrief. Eine durch *C. dubliniensis* verursachte OPC trat durchschnittlich bei einer Viruslast von 125.000 Kopien/ml auf. Der Richtwert der Viruslast, bei dem HIV-Infizierte ein signifikant erhöhtes Risiko für Candida-Infektionen haben, liegt mit 36.000 Kopien/ml niedriger. Diese Differenz spricht dafür, dass *C. dubliniensis* eine geringere Virulenz hat als *C. albicans*. Der allgemein für *Candida Spp.* in der Literatur angegebene Richtwert, ab welcher CD4-Zellzahl bei HIV-Infizierten mit *Candida*-Infektionen zu rechnen ist, hat sich auch für *C. dubliniensis* bestätigt (etwa 200 Zellen/ μ l).

Es gibt keinen signifikanten Unterschied im Auftreten von oropharyngealen *C. dubliniensis*-Infektionen zwischen den Patienten, die mit und solchen, die nicht mit Proteaseinhibitoren behandelt wurden. Die protektive Wirkung, die Proteaseinhibitoren gegen *C. albicans*-Infektionen nachgesagt wird, konnte bezüglich *C. dubliniensis*-Infektionen also nicht bestätigt werden.

6.3 Genotypisierung von *C. dubliniensis* mit der Sonde Cd25

Alle Isolate hatten untereinander einen sehr engen genetischen Verwandtschaftsgrad und gehörten höchstwahrscheinlich geschlossen zu der publizierten Cd25 Gruppe I. Die Mehrzahl der unterschiedlichen Klone trat individuell bei einem Patienten auf. Selten konnte zwar ein gemeinsames Vorkommen des gleichen Klons bei unabhängigen Individuen beobachtet werden, ein Austausch von genetisch identischen *C. dubliniensis*-Stämmen unter Sexualpartnern konnte jedoch nicht gezeigt werden.

In den sequentiellen *C. dubliniensis*-Isolaten der HIV-Patienten zeigten sich am häufigsten kleinere Veränderungen des Genotyps im Rahmen von enger Verwandtschaft. Am zweithäufigsten persistierte der gleiche Isotyp im Verlauf. Selten wurden Klone im Verlauf auch durch andere nicht verwandte Klone ersetzt. Die sequentiellen Klone waren so eng miteinander verwandt, dass die Veränderung des Genotyps in vielen Fällen im Rahmen von progressiver Mikroevolution stattgefunden haben könnte. Es konnte gezeigt werden, dass ein HIV-Patient nicht nur gleichzeitig mit mikroevolutionär verbundenen *C. dubliniensis*-Genotypen kolonisiert bzw. infiziert sein

kann, sondern dass auch nur eng, fast schon lose miteinander verwandte Genotypen nebeneinander vorkommen können.

Mittels Hybridisierung mit der Sonde Cd25 konnten keine genetischen Unterschiede zwischen: 1. *C. dubliniensis*-Isolaten von Patienten mit niedriger (< 36.000 Kopien/ml) und hoher (> 36.000 Kopien/ml) Viruslast und 2. *C. dubliniensis*-Isolaten von Patienten mit ausreichendem (CD4-Zellzahl > 200/ μ l) und schlechtem (CD4-Zellzahl < 200/ μ l) Immunstatus gefunden werden. Die *C. dubliniensis*-Klone der Patienten, die 1. HIV-negativ waren und der Patienten, die 2. unter einer OPC litten, hatten jeweils eine größere genetische Diversität als die Klone von HIV-positiven Patienten bzw. von den Patienten, die asymptomatisch mit *C. dubliniensis* kolonisiert waren. Eine eigene genetische Gruppe wurde von den Klonen der Patienten mit OPC und den Klonen der HIV-negativen Patienten allerdings nicht gebildet. Es gibt also keine mittels Cd25 detektierbare genetische Subpopulation von *C. dubliniensis*, die bevorzugt bei Patienten mit HIV-Infektion und insbesondere bei hoher Viruslast und schlechtem Immunstatus auftritt. Auch die infektiösen *C. dubliniensis*-Isolate stellen im Vergleich zu den kommensalen Isolaten keine gesonderte genetische Subpopulation dar. Durch *C. dubliniensis* verursachte OPC scheint also eher auf den lokalen Immundefekt in der Mundhöhle oder das systemische Immundefizit von HIV-Infizierten als auf das Auftreten eines speziell virulenten *C. dubliniensis*-Stammes zurückzuführen zu sein. Möglicherweise ist das Cd25-fingerprint-Profil nicht ausreichend, um alle *C. dubliniensis*-Genotypen eindeutig voneinander zu unterscheiden.

Es konnte gezeigt werden, dass resistente *C. dubliniensis*-Stämme *in vivo* durch Fluconazol-Therapie selektioniert werden können. Die Mehrzahl der *C. dubliniensis*-Isolate konnten trotz Fluconazol-Exposition ihre Sensibilität gegenüber Fluconazol und Itraconazol erhalten.

Es wurde eine Kreuzresistenz zwischen Fluconazol und Itraconazol beobachtet. Die *C. dubliniensis*-Isolate entwickelten wesentlich häufiger Resistenzen gegen Itraconazol als gegen Fluconazol, auch ohne vorausgehenden antimykotischen Selektionsdruck. Das Mittel der Wahl bei *C. dubliniensis*-Infektionen ist also eher Fluconazol als Itraconazol.

Bei reduzierter Itraconazol-Sensibilität wurden *in vivo* in 21 % der Fälle Variabilitäten des *C. dubliniensis*-Genotyps beobachtet. Meistens (79 %) wurde aber reduzierte Sensibilität gegenüber Fluconazol oder Itraconazol ohne Cd25-Varianten beobachtet.

7 Literatur

1. **Akopyanz, N., N. O. Bukanov, T. U. Westblom, S. Kresovich, and D. E. Berg.** 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **20**:5137-5142.
2. **Al Mosaid, A., D. Sullivan, I. F. Salkin, D. Shanley, and D. C. Coleman.** 2001. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. *J. Clin. Microbiol.* **39**:323-327.
3. **Al Mosaid, A., D. J. Sullivan, and D. C. Coleman.** 2003. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4787-4789.
4. **Al Mosaid, A., D. J. Sullivan, I. Polacheck, F. A. Shaheen, O. Soliman, H. S. Al, T. S. Al, M. Kabadaya, and D. C. Coleman.** 2005. Novel 5-flucytosine-resistant clade of *Candida dubliniensis* from Saudi Arabia and Egypt identified by Cd25 fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4026-4036.
5. **Alves, S. H., E. S. de Loreto, C. E. Linares, C. P. Silveira, L. A. Scheid, D. I. Pereira, and J. M. Santuario.** 2006. Comparison among tomato juice agar with other three media for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **48**:119-121.
6. **Alves, S. H., J. A. Horta, E. P. Milan, L. A. Scheid, M. H. Vainstein, J. M. Santurio, and A. L. Colombo.** 2005. Carbohydrate assimilation profiles of Brazilian *Candida dubliniensis* isolates based on ID 32C system. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **47**:109-111.
7. **Alves, S. H., E. P. Milan, M. L. Branchini, K. Nishimura, K. Fukushima, L. O. Oliveira, J. M. Costa, and A. L. Colombo.** 2001. First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **39**:165-168.
8. **Ashman, R. B. and J. M. Papadimitriou.** 1995. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiol. Rev.* **59**:646-672.
9. **Ball, L. M., M. A. Bes, B. Theelen, T. Boekhout, R. M. Egeler, and E. J. Kuijper.** 2004. Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1673-1679.
10. **Bart-Delabesse, E., P. Boiron, A. Carlotti, and B. Dupont.** 1993. *Candida albicans* genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2933-2937.
11. **Bartlett.** 1998. Medical Management of HIV Infection.

12. **Blignaut, E., C. Pujol, S. Joly, and D. R. Soll.** 2003. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1838-1842.
13. **Boerlin, P., F. Boerlin-Petzold, C. Durussel, M. Addo, J. L. Pagani, J. P. Chave, and J. Bille.** 1995. Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1129-1135.
14. **Boerlin, P., F. Boerlin-Petzold, J. Goudet, C. Durussel, J. L. Pagani, J. P. Chave, and J. Bille.** 1996. Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1235-1248.
15. **Borg-von, Z. M., T. Niederhaus, U. Gross, M. Seibold, M. Monod, and K. Tintelnot.** 2002. Adherence of different *Candida dubliniensis* isolates in the presence of fluconazole. *AIDS* **16**:1237-1244.
16. **Brandt, M. E., L. H. Harrison, M. Pass, A. N. Sofair, S. Huie, R. K. Li, C. J. Morrison, D. W. Warnock, and R. A. Hajjeh.** 2000. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. *Emerg. Infect. Dis.* **6**:46-49.
17. **Campanha, N. H., K. H. Neppelenbroek, D. M. Spolidorio, L. C. Spolidorio, and A. C. Pavarina.** 2005. Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis.* **11**:392-398.
18. **Campell, I. and J. H. Duffus.** 1988. *Yeast, a practical approach*, p. 108-109. IRL Press.
19. **Cantorna, M. T. and E. Balish.** 1991. Role of CD4+ lymphocytes in resistance to mucosal candidiasis. *Infect. Immun.* **59**:2447-2455.
20. **Carr, M. J., S. Clarke, F. O'Connell, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, and B. O'Connell.** 2005. First reported case of endocarditis caused by *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3023-3026.
21. **Chavanet, P., J. Lopez, M. Grappin, A. Bonnin, M. Duong, A. Waldner, M. Buisson, P. Camerlynck, and H. Portier.** 1994. Cross-sectional study of the susceptibility of *Candida* isolates to antifungal drugs and in vitro-in vivo correlation in HIV-infected patients. *AIDS* **8**:945-950.
22. **Chomczynski, P.** 1992. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* **201**:134-139.
23. **Chryssanthou, E., V. Fernandez, and B. Petrini.** 2007. Performance of commercial latex agglutination tests for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* in routine diagnostics. *APMIS* **115**:1281-1284.
24. **Coleman, D. C., D. J. Sullivan, D. E. Bennett, G. P. Moran, H. J. Barry, and D. B. Shanley.** 1997. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS* **11**:557-567.

25. **Coogan, M. M., P. L. Fidel, Jr., M. C. Komesu, N. Maeda, and L. P. Samaranayake.** 2006. (B1) *Candida* and mycotic infections. *Adv. Dent. Res.* **19**:130-138.
26. **Deutsches Institut für Normierung e.V.** Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. [84: Mikrodilution], 2-13. 2002. Berlin, Beuth Verlag.
27. **Donnelly, S. M., D. J. Sullivan, D. B. Shanley, and D. C. Coleman.** 1999. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology* **145 (Pt 8)**:1871-1882.
28. **Fotedar, R. and S. S. Al Hedaithy.** 2004. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive yeasts recovered from the respiratory specimens in HIV-negative patients. *Mycoses* **47**:150-155.
29. **Fotedar, R. and S. S. al-Hedaithy.** 2003. *Candida dubliniensis* at a university hospital in Saudi Arabia. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1907-1911.
30. **Gee, S. F., S. Joly, D. R. Soll, J. F. Meis, P. E. Verweij, I. Polacheck, D. J. Sullivan, and D. C. Coleman.** 2002. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution in vitro and in vivo. *J. Clin. Microbiol.* **40**:556-574.
31. **Giammanco, G. M., G. Pizzo, S. Pecorella, S. Distefano, V. Pecoraro, and M. E. Milici.** 2002. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from an Italian population of human immunodeficiency virus-infected (HIV+) subjects. *Oral Microbiol. Immunol.* **17**:89-94.
32. **Gilfillan, G. D., D. J. Sullivan, K. Haynes, T. Parkinson, D. C. Coleman, and N. A. Gow.** 1998. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* **144**:829-838.
33. **Gottfredsson, M., G. M. Cox, O. S. Indridason, G. M. de Almeida, A. E. Heald, and J. R. Perfect.** 1999. Association of plasma levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA and oropharyngeal *Candida* colonization. *J. Infect. Dis.* **180**:534-537.
34. **Greenspan, D., S. J. Gange, J. A. Phelan, M. Navazesh, M. E. Alves, L. A. MacPhail, R. Mulligan, and J. S. Greenspan.** 2004. Incidence of oral lesions in HIV-1-infected women: reduction with HAART. *J. Dent. Res.* **83**:145-150.
35. **Greenspan, D. and J. S. Greenspan.** 1996. HIV-related oral disease. *Lancet* **348**:729-733.
36. **Greenspan, D., E. Komaroff, M. Redford, J. A. Phelan, M. Navazesh, M. E. Alves, H. Kamrath, R. Mulligan, C. E. Barr, and J. S. Greenspan.** 2000. Oral mucosal lesions and HIV viral load in the Women's Interagency HIV Study (WIHS). *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **25**:44-50.

37. **Hannula, J., M. Saarela, B. Dogan, J. Paatsama, P. Koukila-Kahkola, S. Pirinen, H. L. Alakomi, J. Perheentupa, and S. Asikainen.** 2000. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. *Oral Microbiol. Immunol.* **15**:238-244.
38. **Hartung de Capriles, C., S. Mata-Essayag, C. Perez, M. T. Colella, A. Rosello, C. Olaizola, and S. M. Abate.** 2005. Detection of *Candida dubliniensis* in Venezuela. *Mycopathologia* **160**:227-234.
39. **Hazen, K. C.** 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:462-478.
40. **Hazen, K. C., J. G. Wu, and J. Masuoka.** 2001. Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect. Immun.* **69**:779-786.
41. **Hickman, P. J., J. E. Leigh, R. M. Mera, P. L. Fidel, Jr., and R. B. Luftig.** 2002. Oropharyngeal candidiasis in HIV(+) patients may influence the selection of HIV-1 protease variants. *Virus Res.* **87**:97-106.
42. **Jabra-Rizk, M. A., A. A. Baqui, J. I. Kelley, W. A. Falkler, Jr., W. G. Merz, and T. F. Meiller.** 1999. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **37**:321-326.
43. **Jabra-Rizk, M. A., W. A. Falkler, Jr., W. G. Merz, J. I. Kelley, A. A. Baqui, and T. F. Meiller.** 1999. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1464-1468.
44. **Joly, S., C. Pujol, M. Rysz, K. Vargas, and D. R. Soll.** 1999. Development and characterization of complex DNA fingerprinting probes for the infectious yeast *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1035-1044.
45. **Jones-Carson, J., A. Vazquez-Torres, T. Warner, and E. Balish.** 2000. Disparate requirement for T cells in resistance to mucosal and acute systemic candidiasis. *Infect. Immun.* **68**:2363-2365.
46. **Kao, A. S., M. E. Brandt, W. R. Pruitt, L. A. Conn, B. A. Perkins, D. S. Stephens, W. S. Baughman, A. L. Reingold, G. A. Rothrock, M. A. Pfaller, R. W. Pinner, and R. A. Hajjeh.** 1999. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin. Infect. Dis.* **29**:1164-1170.
47. **Khan, Z. U., S. Ahmad, E. Mokaddas, and R. Chandy.** 2004. Simplified sunflower (*Helianthus annuus*) seed agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:590-592.
48. **Kibbler, C. C., S. Seaton, R. A. Barnes, W. R. Gransden, R. E. Holliman, E. M. Johnson, J. D. Perry, D. J. Sullivan, and J. A. Wilson.** 2003. Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. *J. Hosp. Infect.* **54**:18-24.

49. **Kim, J. O., L. Garofalo, D. Blecker-Shelly, and K. L. McGowan.** 2003. *Candida dubliniensis* infections in a pediatric population: retrospective identification from clinical laboratory isolates of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3354-3357.
50. **Kirkpatrick, W. R., J. L. Lopez-Ribot, R. K. Mcatee, and T. F. Patterson.** 2000. Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. *J. Clin. Microbiol.* **38**:902-904.
51. **Kirkpatrick, W. R., S. G. Revankar, R. K. Mcatee, J. L. Lopez-Ribot, A. W. Fothergill, D. I. McCarthy, S. E. Sanche, R. A. Cantu, M. G. Rinaldi, and T. F. Patterson.** 1998. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar candida screening and susceptibility testing of isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3007-3012.
52. **Korting, H. C., M. Schaller, G. Eder, G. Hamm, U. Bohmer, and B. Hube.** 1999. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2038-2042.
53. **Kurzai, O., W. J. Heinz, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, M. Frosch, and F. A. Muhlschlegel.** 1999. Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated PHR1 and PHR2 genes of *C. albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1587-1590.
54. **Kurzai, O., H. C. Korting, D. Harmsen, W. Bautsch, M. Molitor, M. Frosch, and F. A. Muhlschlegel.** 2000. Molecular and phenotypic identification of the yeast pathogen *Candida dubliniensis*. *J. Mol. Med.* **78**:521-529.
55. **Lees, E. and R. C. Barton.** 2003. The use of Niger seed agar to screen for *Candida dubliniensis* in the clinical microbiology laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect.Dis.* **46**:13-17.
56. **Lilly, E. A., D. J. Hart, J. E. Leigh, S. Hager, K. M. McNulty, D. E. Mercante, and P. L. Fidel, Jr.** 2004. Tissue-associated cytokine expression in HIV-positive persons with oropharyngeal candidiasis. *J. Infect. Dis.* **190**:605-612.
57. **Lockhart, S. R., B. D. Reed, C. L. Pierson, and D. R. Soll.** 1996. Most frequent scenario for recurrent *Candida* vaginitis is strain maintenance with "substrain shuffling": demonstration by sequential DNA fingerprinting with probes Ca3, C1, and CARE2. *J. Clin. Microbiol.* **34**:767-777.
58. **Mähnß, B., F. Stehr, W. Schafer, and K. Neuber.** 2005. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses* **48**:55-61.

59. **Marot-Leblond, A., B. Beucher, S. David, S. Nail-Billaud, and R. Robert.** 2006. Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify *Candida dubliniensis* colonies. *J. Clin. Microbiol.* **44**:138-142.
60. **Martinez, M., J. L. Lopez-Ribot, W. R. Kirkpatrick, B. J. Coco, S. P. Bachmann, and T. F. Patterson.** 2002. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3135-3139.
61. **Martins, M. D., M. Lozano-Chiu, and J. H. Rex.** 1998. Declining rates of oropharyngeal candidiasis and carriage of *Candida albicans* associated with trends toward reduced rates of carriage of fluconazole-resistant *C. albicans* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Infect. Dis.* **27**:1291-1294.
62. **McCullough, M. J., J. J. Jorge, F. Lejbkowicz, E. Lefler, F. Nassar, K. V. Clemons, and D. A. Stevens.** 2004. Genotypic differences of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* isolates related to ethnic/racial differences within the same geographic area. *Mycopathologia* **158**:39-41.
63. **McCullough, M. J., B. Ross, and P. Reade.** 1995. Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* **33**:696-700.
64. **Meiller, T. F., M. A. Jabra-Rizk, A. Baqui, J. I. Kelley, V. I. Meeks, W. G. Merz, and W. A. Falkler.** 1999. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV-seropositive patients in the United States. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **88**:573-580.
65. **Meis, J. F., F. M. Lunel, P. E. Verweij, and A. Voss.** 2000. One-year prevalence of *Candida dubliniensis* in a Dutch university hospital. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3139-3140.
66. **Meis, J. F., M. Ruhnke, B. E. De Pauw, F. C. Odds, W. Siegert, and P. E. Verweij.** 1999. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:150-153.
67. **Metzgar, D., B. A. van, D. Field, R. Haubrich, and C. Wills.** 1998. Random amplification of polymorphic DNA and microsatellite genotyping of pre- and posttreatment isolates of *Candida* spp. from human immunodeficiency virus-infected patients on different fluconazole regimens. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2308-2313.
68. **Meunier, J. R. and P. A. Grimont.** 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* **144**:373-379.

69. **Millon, L., A. Manteaux, G. Reboux, C. Drobacheff, M. Monod, T. Barale, and Y. Michel-Briand.** 1994. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1115-1118.
70. **Morace, G., S. Manzara, and G. Dettori.** 1991. In vitro susceptibility of 119 yeast isolates to fluconazole, 5-fluorocytosine, amphotericin B and ketoconazole. *Chemotherapy* **37**:23-31.
71. **Moran, G. P.** 2002. Emerge of non *Candida albicans* species as pathogena, *In Candida and Candidiasis.*
72. **Moran, G. P., D. Sullivan, J. Morschhauser, and D. Coleman.** 2002. The *Candida dubliniensis* CdCDR1 gene is not essential for fluconazole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2829-2841.
73. **Moran, G. P., D. J. Sullivan, M. C. Henman, C. E. McCreary, B. J. Harrington, D. B. Shanley, and D. C. Coleman.** 1997. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:617-623.
74. **Morgan, J.** 2005. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **7**:429-439.
75. **Mühlhardt, C.** 2002. *Der Experimentator, Molekularbiologie/Genomics.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
76. **Müller, J. and D. Hanschke.** 1978. Diagnostische Wertigkeit der Keimzahl von *Candida*- und *Torulopsis*-Arten klinischen Untersuchungsmaterialien. *Mykosen* **21**:122-124.
77. **NCCLS.** Reference Method for Broth Dilution Antifungal Suspectibility Testing of Yeasts; Approved Standard. M27-A[17]. 1997. Wayne, Pennsylvania.
78. **Neppelenbroek, K. H., N. H. Campanha, D. M. Spolidorio, L. C. Spolidorio, R. S. Seo, and A. C. Pavarina.** 2006. Molecular fingerprinting methods for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis.* **12**:242-253.
79. **Nguyen, M. H., J. E. Peacock, Jr., A. J. Morris, D. C. Tanner, M. L. Nguyen, D. R. Snyderman, M. M. Wagener, M. G. Rinaldi, and V. L. Yu.** 1996. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am. J. Med.* **100**:617-623.
80. **Odds, F. C.** 1988. *Candida and Candidosis: A review and Bibliography.*
81. **Odds, F. C. and R. Bernaerts.** 1994. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1923-1929.
82. **Odds, F. C., N. L. Van, and G. Dams.** 1998. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2869-2873.

83. **Park, S., M. Wong, S. A. Marras, E. W. Cross, T. E. Kiehn, V. Chaturvedi, S. Tyagi, and D. S. Perlin.** 2000. Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2829-2836.
84. **Perea, S., J. L. Lopez-Ribot, B. L. Wickes, W. R. Kirkpatrick, O. P. Dib, S. P. Bachmann, S. M. Keller, M. Martinez, and T. F. Patterson.** 2002. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1695-1703.
85. **Pfaller, M. A.** 1996. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin. Infect. Dis.* **22 Suppl 2**:S89-S94.
86. **Pfaller, M. A. and D. J. Diekema.** 2004. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect.* **10 Suppl 1**:11-23.
87. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, S. A. Messer, L. Boyken, R. J. Hollis, and R. N. Jones.** 2004. In vitro susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **48**:101-105.
88. **Pfaller, M. A., S. A. Messer, S. Gee, S. Joly, C. Pujol, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, and D. R. Soll.** 1999. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* **37**:870-872.
89. **Pfaller, M. A., J. Rhine-Chalberg, S. W. Redding, J. Smith, G. Farinacci, A. W. Fothergill, and M. G. Rinaldi.** 1994. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* **32**:59-64.
90. **Pincus, D. H., D. C. Coleman, W. R. Pruitt, A. A. Padhye, I. F. Salkin, M. Geimer, A. Bassel, D. J. Sullivan, M. Clarke, and V. Hearn.** 1999. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3533-3539.
91. **Pinjon, E., D. Sullivan, I. Salkin, D. Shanley, and D. Coleman.** 1998. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2093-2095.
92. **Polacheck, I., J. Strahilevitz, D. Sullivan, S. Donnelly, I. F. Salkin, and D. C. Coleman.** 2000. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. *J. Clin. Microbiol.* **38**:170-174.
93. **Powderly, W. G.** 1992. Mucosal candidiasis caused by non-albicans species of *Candida* in HIV-positive patients. *AIDS* **6**:604-605.
94. **Pschyrembel.** 1994. *Klinisches Wörterbuch*, p. 1409. Walter de Gruyter, Berlin.
95. **Ruhnke, M.** 2003. *Pilzinfektionen bei immunsupprimierten Patienten*, p. 50-57. UNI-MED, Bremen.

96. **Ruhnke, M., A. Schmidt-Westhausen, and J. Morschhauser.** 2000. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:291-295.
97. **Sahand, I. H., M. D. Moragues, R. Robert, G. Quindos, and J. Ponton.** 2006. Evaluation of Bichro-Dubli Fumouze to distinguish *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **55**:165-167.
98. **Salkin, I. F., W. R. Pruitt, A. A. Padhye, D. Sullivan, D. Coleman, and D. H. Pincus.** 1998. Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1467.
99. **Samaranayake, Y. H., L. P. Samaranayake, R. S. Dassanayake, J. Y. Yau, W. K. Tsang, B. P. Cheung, and K. W. Yeung.** 2003. 'Genotypic shuffling' of sequential clones of *Candida albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. *J. Med. Microbiol.* **52**:349-359.
100. **Samaranayake, Y. H., L. P. Samaranayake, E. H. Pow, V. T. Beena, and K. W. Yeung.** 2001. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3296-3302.
101. **Sambrook, J. and D. W. Russell.** 2001. Bacteriophage Lambda and its Vectors, p. 2.40-2.44. *In* J. Argentine (ed.), *Molecular cloning, A Laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
102. **Sangeorzan, J. A., S. F. Bradley, X. He, L. T. Zarins, G. L. Ridenour, R. N. Tiballi, and C. A. Kauffman.** 1994. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am. J. Med.* **97**:339-346.
103. **Schmid, J., F. C. Odds, M. J. Wiselka, K. G. Nicholson, and D. R. Soll.** 1992. Genetic similarity and maintenance of *Candida albicans* strains from a group of AIDS patients, demonstrated by DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **30**:935-941.
104. **Schmid, J., M. Rotman, B. Reed, C. L. Pierson, and D. R. Soll.** 1993. Genetic similarity of *Candida albicans* strains from vaginitis patients and their partners. *J. Clin. Microbiol.* **31**:39-46.
105. **Schmidt-Westhausen A.M.** 2003. Erkrankungen- Haut und Schleimhaut, p. 50-57. *In* Ruhnke M. (ed.), *Pilzinfektionen bei immunsupprimierten Patienten*. Uni-Med-Verlag AG, Bremen.
106. **Schoofs, A., F. C. Odds, R. Colebunders, M. Ieven, and H. Goossens.** 1997. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**:296-300.

107. **Schröppel, K., M. Rotman, R. Galask, K. Mac, and D. R. Soll.** 1994. Evolution and replacement of *Candida albicans* strains during recurrent vaginitis demonstrated by DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2646-2654.
108. **Schuman, P., J. D. Sobel, S. E. Ohmit, K. H. Mayer, C. C. Carpenter, A. Rompalo, A. Duerr, D. K. Smith, D. Warren, and R. S. Klein.** 1998. Mucosal candidal colonization and candidiasis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. *Clin. Infect. Dis.* **27**:1161-1167.
109. **Soll, D. R.** 2000. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:332-370.
110. **Soll, D. R., R. Galask, S. Isley, T. V. Rao, D. Stone, J. Hicks, J. Schmid, K. Mac, and C. Hanna.** 1989. Switching of *Candida albicans* during successive episodes of recurrent vaginitis. *J. Clin. Microbiol.* **27**:681-690.
111. **Soll, D. R., R. Galask, J. Schmid, C. Hanna, K. Mac, and B. Morrow.** 1991. Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida* spp. carried in different anatomical locations of the same healthy women. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1702-1710.
112. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
113. **Staib, P. and J. Morschhauser.** 1999. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* **42**:521-524.
114. **Sullivan, D. J., D. Bennett, M. Henman, P. Harwood, S. Flint, F. Mulcahy, D. Shanley, and D. Coleman.** 1993. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2124-2133.
115. **Sullivan, D. J. and D. Coleman.** 1998. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J. Clin. Microbiol.* **36**:329-334.
116. **Sullivan, D. J., K. Haynes, J. Bille, P. Boerlin, L. Rodero, S. Lloyd, M. Henman, and D. Coleman.** 1997. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Clin. Microbiol.* **35**:960-964.
117. **Sullivan, D. J., M. C. Henman, G. P. Moran, L. C. O'Neill, D. E. Bennett, D. B. Shanley, and D. C. Coleman.** 1996. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *J. Med. Microbiol.* **44**:399-408.
118. **Sullivan, D. J., G. P. Moran, and D. C. Coleman.** 2005. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**:9-17.

119. **Sullivan, D. J., T. J. Westerneng, K. A. Haynes, D. E. Bennett, and D. C. Coleman.** 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **141 (Pt 7)**:1507-1521.
120. **Swaminathan, B. and G. M. Matar.** 1999. Molecular Typing Methods, p. 26-50. *In* D.H.Persing, T.F.Smith, F.C.Tenover, and T.J.White (eds.), *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications*. Washington, D.C.
121. **Tintelnot, K., G. Haase, M. Seibold, F. Bergmann, M. Staemmler, T. Franz, and D. Naumann.** 2000. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1599-1608.
122. **Tortorano, A. M., J. Peman, H. Bernhardt, L. Klingspor, C. C. Kibbler, O. Faure, E. Biraghi, E. Canton, K. Zimmermann, S. Seaton, and R. Grillot.** 2004. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**:317-322.
123. **Tsang, C. S. and L. P. Samaranayake.** 1999. Factors affecting the adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells in human immunodeficiency virus infection. *Br. J. Dermatol.* **141**:852-858.
124. **Tyler, K. D., G. Wang, S. D. Tyler, and W. M. Johnson.** 1997. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **35**:339-346.
125. **Welsh, J. and M. McClelland.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**:7213-7218.
126. **Whelan, W. L., D. R. Kirsch, K. J. Kwon-Chung, S. M. Wahl, and P. D. Smith.** 1990. *Candida albicans* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: absence of a novel of hypervirulent strain. *J. Infect. Dis.* **162**:513-518.
127. **Willinger, B., C. Hillwoth, B. Selitsch, and M. Manafi.** 2001. Performance of candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3793-3795.
128. **Willis, A. M., W. A. Coulter, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, J. R. Hayes, P. M. Bell, and P. J. Lamey.** 2000. Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. *J. Oral Pathol. Med.* **29**:86-90.
129. **Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond.** 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **39**:309-317.
130. **YOU DEN, W. J.** 1950. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* **3**:32-35.

8 Anhang

8.1 Geräte und Materialien

Tabelle 12.

Gerät	Firma	Gerätenummer
Abzug	Köttermann, Hänigsen	Typ 2-450-DAHD
Behälter für Rachenspülwasser	Sarstedt, Nümbrecht	3474262
Blotmembran Hybond-N+	Amersham Biosciences, Freiburg	RPN 2020 BPL
Brutschrank	Haraeus, Hanau	Typ B5028
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig	#1
Durchleuchtungstisch	FAME D-1, Polen	L-110
sterile Einmalspritzen, 5 ml	Braun, Melsungen	17094 LO501
Eisautomat	Scotsman, Schottland	AF-10*
Elektrophoresekammer (Verdau)	OWL, Portsmouth, USA	Model A5 (800-242-5560)
Elektrophoresekammer (PCR)	LifeTechnologies, Gaithersburg, USA	Horizon 11-14
Entwicklungsautomat	Kodak, N.Y., USA	X-OMAT Multiloader 300 Plus
Feinwaage MC 1	Sartorius, Göttingen	RC 210 P
Filmkassette	Kodak, N.Y., USA	X-Omatic cassette
Filterpapier	Hofer, Scientific Instruments, S.F., USA	80-6211-29
Heißluftschrank	Haraeus, Hanau	UT20
Heizplatte	Klees, Düsseldorf	
Heizplatte Isotopenlabor	UniEquip, Martinsried	Unimaag AARE
Horizontalschüttler Celloshaker variospeed/ variotime	Renner GmbH, Dannstadt	35 114
Hybridisierungssofen	GFL, Burgwedel	7601
Hybridisierungsröhrchen	GFL, Burgwedel	7945
Impfschlinge	NUNC Brand Products, Dänemark	253287
Klarsichtfolie (Cling Film)	Bartling-Werke, Selm-Bork	EAN 40 06897 520511
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach	MR 2000
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen	380078-0030

Mikrotiterplatten, U-Form	Greiner bio-one, Frickenhausen	650101
Mikrowelle	Jump	R 59
Papiertücher	TORK	
Parafilm	American National Can, Greenwich	
PC-Programm 1	Scanalytics, Frankfurt/Main	Gelscan V5.1
PC-Programm 2	Scientific Imaging Systems, New Haven	Kodak Digital Science 1D, Version 2.0.3
PC-Programm 3	Adobe System Inc., Unterschleißheim	Adobe Photoshop Version D1-4.0
PC-Programm 4	MedCalc	Version 9.2
PC-Programm 5	SPSS	Version 13.0
PCR-Platz	Herolab, Wlesloch	CleneCab
Petrischalen, 90 mm	Bibby Sterilin Ltd, England	101 VR 20
Photometer	Eppendorf, Hamburg	1101 M
Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Fernwald	PIPETBOY acu
Plastikpipette	Falcon	357525
Plastikröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht	55.478
Protect-Bacterial Preservers	Mickley-Diagnostica GmbH, Berlin	12509
Quarz-Küvette	Hellman	
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg	0030 121.023
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg	0030 125.150
Röntgenfilm Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg	RPN 3103K
Safety Screen	Amersham Biosciences, Freiburg	RPN 1536
Scanner	Epson Perfection	1670
Standzentrifuge	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau	Varifuge-RF 151318
Stromversorgungsgerät	Hofer, Scientific Instruments, S.F., USA	PS500XT DC
Taumelrollmischer	IDL, Nidderau	TRM 56
Thermocycler	Biometra, Göttingen	TRIO-Thermoblock
Tischzentrifuge	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau	Biofuge 13
UV/visible Spectrometer	Amersham Biosciences, Freiburg	Ultrospec 2100 pro
UV-Digitalkamera	Kodak, N.Y., USA	Science DC 120 Zoom

UV-Transilluminator	Hofer, Scientific Instruments, S.F., USA	Mighty Bright
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, N.Y., USA	G-560E
Waage	Mettler, Giessen	1200
Wärmeblock 1	Roth, Karlsruhe	Test Tube Thermostat-TCR 100
Wärmeblock 2	Eppendorf, Hamburg	Thermomixer 5436
Wasseraufbereitung Reinstwasser System	IMB, Köln	
Wasserbad	GFL, Burgwedel	1083
Wasserbad Isotopenlabor	Memmert GmbH, Schwabach	WB 10

8.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 13.

Reagenz	Zusammensetzung	Hersteller	Bestellnummer
Agarose		Serva, Heidelberg	12314
Agarose Bacto-Agar®		Difco, USA	85693AJA
Agarose-Gel (0,8 % für Southern Blot)	TAE, Agarose	Qbiogene, USA	
Agarose-Gel (1,2 % für PCR)	TBE, Agarose	Serva, Heidelberg	42557
AlkPhos Direct®	Labelling reagent, Cross-linker solution, Reaction buffer, Water, Control unlabelled DNA, Hybridization buffer, Blocking reagent	Amersham Biosciences, Freiburg	RPN 3680
API® ID 32 C	Teststreifen, Deckel, API® C Medium	bioMérieux, Frankreich	32 200
Aqua destillata		Braun, Melsungen	2351544
Bacto vitaminfree Casamino acids		Difco, USA	0288-01
BBL-TM Sabouraud Dextrose-Agar		Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA	211584

Chloroform		Merck, Darmstadt	2445. 2500 313 K19411545
Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1)		Amresco, Ohio	X205
CHROMagar Candida®		Mast Diagnostica, Reinfeld	150409
<i>Cryptococcus</i> - Agar		heipha, Eppenheim	375e
Denaturations- lösung Southern Blot	0,4M NaOH, 3M NaCl	Merck, Darmstadt	1.064.045
DNase I, Rnase-free		Roche, Mannheim	776785
DNS-Polymerase AmpliTaq		Roche Applied Biosystems, CA, USA	N808-0166
dNTP		Roche Applied Biosystems, CA, USA	N808-0007
<i>E. coli</i> LE 392		Coleman et al., Dublin, Ireland	
EcoR I		Invitrogen GmbH, Karlsruhe	15202-021
EDTA		Sigma, Steinheim	E-5134
Ethanol 70 %	Ethanol 96 %, Aqua dest.	Merck, Darmstadt	100.971
Ethidiumbromid		Serva, Heidelberg	21238
Fluconazol- Stocklösung (1280 µg/ml)	Fluconazol-Pulver, Aqua dest.	Pfizer	
Gelladepuffer		Sigma, Steinheim	G-2526
GeneAmp PCR-Puffer		Roche Applied Biosystems, CA, USA	N808-0006
HCl		Merck, Darmstadt	1.09063
Hybridisierungs- puffer Rapid- Hyb-Buffer®		Amersham Biosciences, Freiburg	RPN 1636
Isopropanol		Merck, Darmstadt	109.634

Itraconazol-Stocklösung	Itraconazol, Dimethyl Sulfoxid	Janssen Biotech N.V.	30.211.44
Kontrollstamm ATCC 90028	<i>C. albicans</i>	American Type Culture Collection	
Lachssperma DNS-Lösung		Invitrogen GmbH, Karlsruhe	15632-011
Magermilch („Skim Milk“)		Difco Laboratories, Detroit, USA	0032-17-3
McFarland-Standard 0,5		bioMérieux, Frankreich	70 900
McFarland-Standard 2		bioMérieux, Frankreich	70 900
Megaprime DNA Labelling System®	Primer solution, dNTPs, Reaction buffer, Enzyme solution, Standard DNA solution, Carrier DNA solution	Amersham Biosciences, Freiburg	RPN 1604
Mercaptoethanol		Serva, Heidelberg	28625
MgCl		Sigma, Steinheim	M-8266
Molekulargewichtsmarker Lambda Hind III		Amersham Biosciences, Freiburg	27-4048-01
Molekulargewichtsmarker VI		Roche Applied Biosystems, CA, USA	85829720
Na ₃ Citrat		Sigma, Steinheim	S-4641
NaCl		Merck, Darmstadt	1.064.045
NaCl-EDTA-Lösung	0,15M NaCl, 0,1M EDTA	Merck, Darmstadt	1.064.045
NaOH		Merck, Darmstadt	64.981
NZCYM Brühe		Sigma, Steinheim	N-3643
PEG 8000		Sigma, Steinheim	P-2139
Phagensuspension mit Cd25		Coleman et al., Dublin	
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)		Amresco, Ohio, USA	883
Primer RP02		TibMolbiol MOLBIOL, Berlin	5'gCg ATC CCCA 3'

Proteinase K		Merck, Darmstadt	1.245.680. 100
Rachen- spülwasser	10 ml isotone NaCl-Lösung	Braun, Melsungen	2350548
radiomarkierte dNTPs		Amersham Biosciences, Freiburg	
Reisagar		heipha, Eppelheim	350e
Restriktionspuffer React 3®		Invitrogen GmbH, Karlsruhe	16303-018
RNase, DNase-free		Roche, Mannheim	1.119.915
Sabouraud- Dextrose-Brühe		Difco Laboratories, Detroit, USA	382179
SDS		Merck, Darmstadt	13760
SE-Puffer	0,1M EDTA, 1M Sorbitol		
Sorbitol		Sigma, Steinheim	S-6021
SSC (20x)	0,3M Na ₃ Citrat, 3M NaCl		
TAE		Qbiogene, USA	TAE50X01
TBE		Serva, Heidelberg	42557
TE-Puffer	100mM Tris-Cl, 10 mM EDTA		
Transferlösung Southern Blot (pH 11,4 - 11,45)	3M NaCl, 8mM NaOH	Merck, Darmstadt	1.064.045
Tris-Cl		Sigma, Steinheim	T-5941
Waschpuffer I	2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS		
Waschpuffer II	1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS		
Wizard Lambda Preps DNA Purification System®		Promega, USA	A7290
YST-Lösung	modifiziertes HR-Medium	Sifin, Berlin	TN 1283
Zymolase-20T		ICN, Ohio	32-092

8.3 Abkürzungsverzeichnis

5FC	5-Flucytosin
81/222	81 von 222 Proben
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AML	Akute Myeloische Leukämie
API	Analytischer Profilindex
AP-PCR	Arbitrarily Primed Polymerase Chainreaction
Aqua dest.	Aqua destillata (lat.), destilliertes Wasser
ATCC	The American Type Culture Collection
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BK	Blutkultur
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cART	combined Anti-Retroviral Therapy
<i>C. dub.</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>C.</i>	<i>Candida</i>
cALL	common Acute Lymphoblastic Leukemia
CD	Cluster of differentiation
CI	Chloroform/Isoamyalkohol
Ci/mmol	Curie/Millimol
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie Virus
cop	Kopien
CS	Chlamydosporen
d _(Eu)	Euklidisches Distanzmaß
Dat.	Datum
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribo-Nukleosid-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
Fluco	Fluconazol
FUR	Uracil Phosphoribosyltransferase
Geb.-Dat.	Geburtstagsdatum
g	Gramm
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HR-Medium	High-Resolution-Medium
Itra	Itraconazol
J.	Jahr(e)
KBE	Koloniebildende Einheiten
kbp	Kilo-Basenpaare
KM-Tx	Knochenmarkstransplantation
M	molar
Mg	Magnesium
MgCl	Magnesiumchlorid
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
min	Minute
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ng	Nanogramm
o. g.	oben genannt
OD	Optische Dichte
OPC	Oropharyngeale Candidose
P	Phosphat

po	per os
Pat.	Patient
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PEG	Polyethylenglycol
Pfu	Plaque forming units
pg	Pikogramm
PI	Proteinaseinhibitor
PM	Pseudomyzel
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNS	ribosomale RNS
RSW	Rachenspülwasser
S _{AB}	Similaritätskoeffizient berechnet nach Dice
S-DD	dosisabhängig sensibel
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
s	Sekunde
SE-Puffer	Sorbitol-EDTA-Puffer
Sp.	Spezies
sp. nov.	Spezies novum
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tbc	Tuberkulose
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	volume by volume (ml gelöst in ml)
vs.	versus
w/v	weight by volume (g gelöst in ml)
Y-Index	Youden-Index
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.4 Ergebnisse der unterschiedlichen Identifizierungsmethoden

Tabelle 14. Ein „Minus“ bedeutet, dass der jeweilige Test nicht durchgeführt werden konnte.

Nr.	Pat.	Probe	Datum	Art der Probe	PCR	KBE/ml	CHROMagar Candida®	Staibagar	Reisagar	API® ID 32 C	C. dub.-typisch	Cd25	42°C	45°C
1	1	C	04.11.1994	RSW	C. dub.	10	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2p	-	-
2	1	D	09.02.1995	RSW	C. dub.	100	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2a	-	-
3	1	E	18.09.1995	RSW	C. dub.	10-100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2p	ja	nein
4	1	F	16.11.1995	RSW	C. dub.	10-100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2p	-	-
5	1	H	04.09.1996	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2p	ja	nein
6	1	I	31.03.1997	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2p	ja	nein
7	1	K	17.09.1997	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2p	ja	nein
8	1	L	10.12.1997	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2p	ja	ja
9	1	N	12.02.1998	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2p	-	-
10	1	O	11.03.1998	RSW	C. dub.	1	grün	-	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2a	ja	nein
11	1	P	06.05.1998	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2p	ja	nein
12	1	Q	25.11.1998	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS++	7142100015	ja	Klon 2a	ja	nein
13	1	R	01.12.1998	RSW	C. dub.	100	dunkelgrün	rau	PM+/CS++	7142100015	ja	Klon 2a	ja	nein
14	1	S	23.02.1999	RSW	C. dub.	10-100	grün	rau	PM (kurz+)/CS++	7142140015	ja	Klon 2a	ja	nein
15	1	T	26.10.1999	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM (kurz+)/CS++	7142140015	ja	Klon 9	ja	nein
16	1	U	16.03.2000	RSW	C. dub.	10	dunkelgrün	rau	PM (kurz+)/CS++	7142140015	ja	Klon 2b	ja	nein
17	1	V	16.05.2000	RSW	C. dub.	10	grün	-	PM (kurz+)/CS++	7142140015	ja	Klon 2a	ja	nein
18	2	A1	31.08.1990	RSW	C. dub.	100	dunkelgrün	rau	-	7142140015	ja	Klon 2v	ja	nein
19	2	D	20.02.1991	RSW	C. dub.	500	dunkelgrün	rau	-	7142140015	ja	Klon 2u	-	-
20	2	E	27.03.1991	RSW	C. dub.	10 ³	dunkelgrün	rau	-	7142140015	ja	Klon 2u	-	-
21	2	F	24.04.1991	RSW	C. dub.	10 ³	dunkelgrün	rau	-	7142140015	ja	Klon 2v	-	-
22	2	F1	31.05.1991	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	rau	-	7142140015	ja	Klon 2v	ja	nein
23	3	E	29.07.1994	RSW	C. dub.	10 ²⁻³	-	-	PM+/CS+	-	-	Klon 2ab	-	-
24	3	F	22.09.1994	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2ab	-	-
25	3	G	22.12.1994	RSW	C. dub.	10 ²⁻³	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2ab	ja	nein
26	3	H	26.01.1995	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2ab	-	-
27	4	A	29.06.1995	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2q	ja	nein
28	5	A	12.04.1995	RSW	C. dub.	10 ³	grün	-	PM+/CS+	-	-	Klon 7	-	-
29	6	F	01.12.1994	RSW	C. dub.	100	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 3a	-	-
30	6	H	02.02.1995	RSW	C. dub.	100	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 3b	-	-
31	6	I	02.03.1995	RSW	C. dub.	100	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 3a	-	-

Nr.	Pat.	Probe	Datum	Art der Probe	PCR	KBE/ml	CHROMagar Candida®	Staibagar	Reisagar	API® ID 32 C	C. dub.-typisch	Cd25	42°C	45°C
32	6	J	06.04.1995	RSW	C. dub.	10	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 3a	ja	nein
33	6	K	28.11.1995	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 3b	ja	nein
34	6	L	03.06.1996	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM (kurz)+/CS+	7142140015	ja	Klon 3b	-	-
35	6	M	02.04.1997	RSW	C. dub.	10 ³	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 3b	-	-
36	6	N	20.05.1997	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 3b	ja	nein
37	6	T	05.07.2002	RSW	C. dub.	Rasen	grün	glatt	PM+/CS+	7147140015	nein	Klon 3b	ja	nein
38	7	A	28.11.1995	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5h	ja	nein
39	7	B	19.02.1996	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5h	-	-
40	8	A	19.11.1990	RSW	C. dub.	-	dunkelgrün	rau	-	7142140015	ja	Klon 4c	ja	nein
41	9	B	22.08.1994	RSW	C. dub.	100	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 4a	ja	ja
42	9	E	13.10.1994	RSW	C. dub.	100	grün	-	PM+/CS+	7142100015	ja	Klon 4a	-	-
43	9	F	03.11.1994	RSW	C. dub.	10 ³	grün	-	PM+/CS+	7142100015	ja	Klon 4a	-	-
44	10	1	28.08.1989	RSW	C. dub.	-	dunkelgrün	rau	-	7142140015	ja	Klon 2c	-	-
45	10	4	04.07.1990	RSW	C. dub.	-	-	-	-	7142140015	ja	Klon 2c	-	-
46	10	5b	30.07.1990	RSW	C. dub.	-	dunkelgrün	rau	-	7142140015	ja	Klon 2c	ja	nein
47	10	7	10.09.1990	RSW	C. dub.	10 ⁴	dunkelgrün	rau	-	7142140015	ja	Klon 2c	ja	nein
48	11	1	20.12.1993	RSW	C. dub.	20	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2t	ja	nein
49	11	2	15.09.1994	RSW	-	10	-	-	PM+/CS+	7142140015	ja	-	-	-
50	11	3	13.10.1994	RSW	C. dub.	100	-	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2t	-	-
51	11	4	10.11.1994	RSW	C. dub.	40	grün	-	PM+/CS+	7142100015	ja	kein Bandenmuster	-	-
52	11	5	02.02.1995	RSW	C. dub.	30	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2t	ja	nein
53	11	6	06.11.1995	RSW	C. dub.	200	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2i	ja	nein
54	11	7	22.01.1996	RSW	C. dub.	140	grün	-	PM+/CS+	7142100015	ja	-	-	-
55	11	8	05.02.1996	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2t	ja	nein
56	11	9	04.03.1996	RSW	C. dub.	10	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2t	ja	nein
57	11	10	01.04.1996	RSW	C. dub.	10	-	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2t	-	-
58	11	11	30.05.1996	RSW	C. dub.	40	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2t	-	-
59	11	12	27.06.1996	RSW	C. dub.	40	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2t	-	-
60	11	13	19.08.1996	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2i	ja	nein
61	11	14	17.09.1996	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2t	-	-
62	11	15	15.10.1996	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2i	ja	nein
63	11	16	28.04.1997	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2t	ja	nein
64	11	17	18.06.1997	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2i	ja	nein
65	11	22	11.03.1998	RSW	C. dub.	300	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2t	ja	nein

Nr.	Pat.	Probe	Datum	Art der Probe	PCR	KBE/ml	CHROMagar Candida®	Staibagar	Reisagar	API® ID 32 C	C. dub.-typisch	Cd25	42°C	45°C
66	11	23	15.07.1998	RSW	C. dub.	40	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2t	ja	nein
67	11	25	16.09.1998	RSW	C. dub.	10-100	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2i	-	-
68	11	26	03.11.1998	RSW	C. dub.	100	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2j	ja	nein
69	11	27	01.12.1998	RSW	C. dub.	30	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2i	ja	nein
70	11	28	05.01.1999	RSW	C. dub.	40	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2t	ja	nein
71	11	29a	02.03.1999	RSW	C. dub.	100-170	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2t	ja	nein
72	11	30	13.04.1999	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM++/CS++	7142140015	ja	Klon 2i	ja	nein
73	11	31	11.05.1999	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2i	ja	nein
74	11	32	13.07.1999	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7147340015	nein	Klon 2i	ja	nein
75	11	34	11.01.2000	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2k	ja	nein
76	11	36	05.04.2000	RSW	C. dub.	10	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7042100015	ja	Klon 2l	ja	nein
77	13	1	17.10.1990	RSW	C. dub.	210	grün	rau	-	7142100015	ja	Klon 1a	nein	ja
78	14	3	20.02.1995	RSW	C. dub.	10 ³	grün	rau	PM+/CS+	7142100015	ja	Klon 2d	ja	nein
79	14	10	24.07.1996	RSW	C. dub.	10 ⁴⁻⁵	grün	rau	PM (kurz)+/CS+	7142140015	ja	Klon 2w	ja	ja
80	14	13	17.02.1997	RSW	C. dub.	10 ³	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2d	-	-
81	14	14	24.02.1997	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2d	ja	nein
82	14	16	18.06.1997	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142100015	ja	Klon 2d	ja	nein
83	14	17	17.09.1997	RSW	C. dub.	-	grün	rau	PM (kurz)+/CS+	7142140015	ja	Klon 2d	ja	nein
84	14	18	17.12.1997	RSW	C. dub.	10 ³	grün	-	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2x	-	-
85	14	19	19.02.1998	RSW	C. dub.	10-100	hellgrün	-	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2d	-	-
86	14	22	08.07.1998	RSW	C. dub.	100	hellgrün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2d	ja	nein
87	14	24	03.11.1998	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2w	ja	nein
88	14	25	15.04.1999	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM (kurz)+/CS++	7142100015	ja	Klon 2d	ja	nein
89	14	27	29.06.1999	RSW	C. dub.	100	dunkelgrün	rau	PM+/CS++	7142100015	ja	Klon 2d	ja	nein
90	14	28	12.10.1999	RSW	C. dub.	100	hellgrün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2d	ja	nein
91	14	29	24.02.2000	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2d	ja	nein
92	14	31	10.09.2001	RSW	C. dub.	10-100	hellgrün	-	PM (lang)+/CS+	7142140015	ja	Klon 2d	-	-
93	15	4	05.05.1994	RSW	C. dub.	10	grün	-	PM++/CS++	7147340015	nein	-	-	-
94	15	5	02.06.1994	RSW	C. dub.	10	-	-	PM+/CS+	-	-	-	-	-
95	15	6	12.07.1994	RSW	C. dub.	10-100	grün	-	-	7142140015	ja	-	-	-
96	15	9	15.09.1994	RSW	C. dub.	100	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	-	-	-
97	15	18	19.12.1995	RSW	C. dub.	100	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2i	ja	nein
98	16	1	10.06.1998	BAL	C. dub.	10 ³⁻⁴	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2e	ja	nein
99	16	2	17.06.1998	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2f	ja	nein
100	16	4	29.09.1998	RSW	C. dub.	10-100	dunkelgrün	rau	PM+/CS++	7142100015	ja	Klon 2e	ja	nein

Nr.	Pat.	Probe	Datum	Art der Probe	PCR	KBE/ml	CHROMagar Candida®	Staibagar	Reisagar	API® ID 32 C	C. dub.-typisch	Cd25	42°C	45°C
101	16	6	01.12.1998	RSW	C. dub.	100	dunkelgrün	rau	PM+/CS++	7142100015	ja	Klon 2f	-	-
102	17	4	30.05.1994	RSW	C. dub.	100	-	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2g	-	-
103	17	5	27.10.1994	RSW	C. dub.	10 ⁴	dunkelgrün	rau	PM (kurz+)/CS+	7142140015	ja	Klon 2g	ja	nein
104	18	1	02.11.1995	RSW	C. dub.	20	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 4b	ja	nein
105	18	2	09.11.1995	RSW	C. dub.	20	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6g	ja	nein
106	19	1	12.04.1995	RSW	C. dub.	400	grün	-	PM+/CS+	-	-	Klon 2z	-	-
107	21	1	08.05.1991	RSW	C. dub.	2x10 ³	grün	rau	-	7142140015	ja	Klon 5f	ja	nein
108	21	2	03.07.1991	RSW	C. dub.	10 ³	grün	rau	-	7142140015	ja	Klon 5e	ja	nein
109	21	3	17.05.1993	RSW	C. dub.	-	grün	rau	-	7142140015	ja	Klon 5f	ja	nein
110	21	4	06.09.1993	RSW	C. dub.	20	grün	rau	PM(+)/CS+	7142140015	ja	Klon 5f	ja	nein
111	21	5	09.11.1993	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5e	ja	nein
112	21	6	06.12.1993	RSW	C. dub.	60	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5f	ja	nein
113	21	13	09.05.1994	RSW	C. dub.	10 ³	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5f	ja	nein
114	21	15	30.05.1994	RSW	C. dub.	Rasen	grün	glatt	PM (kurz+)/CS+	7142140015	ja	Klon 5f	ja	nein
115	21	16	16.06.1994	RSW	C. dub.	10 ³	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5f	ja	nein
116	21	17	11.07.1994	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5f	ja	nein
117	21	20	08.08.1994	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5f	ja	nein
118	21	21	19.09.1994	RSW	C. dub.	2x10 ³	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5f	ja	nein
119	21	23	24.10.1994	RSW	C. dub.	10 ³	grün	rau	PM (kurz+)/CS+	7142140015	ja	Klon 5f	ja	nein
120	21	24	07.11.1994	RSW	C. dub.	10 ²⁻³	grün	rau	PM (kurz+)/CS+	7142140015	ja	Klon 5f	nein	nein
121	21	25	21.11.1994	RSW	C. dub.	100	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5f	nein	nein
122	21	28	19.12.1994	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	rau	PM+/CS+	7142100015	ja	Klon 5f	nein	nein
123	22	8	30.05.1996	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142100015	ja	Klon 5a	-	-
124	22	9	27.06.1996	RSW	C. dub.	50	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5a	-	-
125	22	10	27.08.1997	RSW	C. dub.	10 ³⁻⁴	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 5a	-	-
126	22	11	24.09.1997	RSW	C. dub.	10 ²⁻³	grün	rau	PM+/CS++/Triplets	7142140015	ja	Klon 5a	ja	nein
127	22	12	29.10.1997	RSW	C. dub.	10 ²⁻³	grün	rau	PM+/CS++/Triplets	7142140015	ja	Klon 8	ja	nein
128	22	14	25.05.1998	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS++/Triplets	7142140015	ja	Klon 5a	ja	nein
129	22	15	04.06.1998	RSW	C. dub.	30	grün	rau	PM+/CS++/Triplets	7142140015	ja	Klon 5i	ja	nein
130	22	17	02.09.1998	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+/Triplets	7142100015	ja	Klon 5a	ja	nein
131	22	20	11.06.1999	RSW	C. dub.	250	dunkelgrün	rau	PM+/CS+/Duplets	7142100015	ja	Klon 5a	ja	nein
132	22	21	29.07.1999	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 5a	ja	nein
133	22	22	22.10.1999	RSW	C. dub.	500	grün	rau	PM+/CS++/Duplets	7142140015	ja	Klon 5a	ja	nein
134	23	1	21.08.1997	RSW	C. dub.	10-100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2s	ja	nein

Nr.	Pat.	Probe	Datum	Art der Probe	PCR	KBE/ml	CHROMagar Candida®	Staibagar	Reisagar	API® ID 32 C	C. dub.-typisch	Cd25	42°C	45°C
135	24	1b	07.06.1995	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142100015	ja	Klon 2r	ja	nein
136	25	2	28.11.1994	RSW	C. dub.	10 ⁴	hellgrün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2w	nein	nein
137	25	2a	12.12.1994	RSW	-	10 ⁴	grün	-	PM+/CS+	7143140015	ja	-	-	-
138	25	2b	19.12.1994	RSW	-	10 ³	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	-	-	-
139	25	3	02.01.1995	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2w	ja	nein
140	25	4	06.02.1995	RSW	C. dub.	10 ³	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2h	ja	nein
141	25	5	06.03.1995	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2h	ja	nein
142	26	2	22.05.1995	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5g	ja	nein
143	26	3	17.07.1995	RSW	C. dub.	100	grün	glatt	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5g	ja	ja
144	26	4	11.09.1995	RSW	C. dub.	10-100	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5c	-	-
145	26	6	02.10.1995	RSW	C. dub.	10	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5c	ja	nein
146	26	7	30.10.1995	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5b	ja	nein
147	26	9	28.11.1995	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5g	ja	nein
148	26	10	19.12.1995	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5b	ja	nein
149	26	11	29.01.1996	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5c	-	-
150	26	13	20.05.1996	RSW	C. dub.	10	dunkelgrün	rau	PM (kurz)+/CS+	7142140015	ja	Klon 5g	-	-
151	26	14	17.06.1996	RSW	C. dub.	10	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5c	-	-
152	26	15	08.07.1996	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5c	-	-
153	26	16	09.09.1996	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142100015	ja	Klon 5g	-	-
154	26	17	07.10.1996	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5d	ja	nein
155	26	18	19.11.1996	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5g	ja	nein
156	26	19	03.03.1997	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5d	ja	nein
157	26	21	02.05.1997	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5c	-	-
158	26	22	28.05.1997	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5h	-	-
159	26	23	23.07.1997	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5h	-	-
160	26	24	11.08.1997	RSW	C. dub.	10 ³	grün	rau	PM+/CS+	7147340015	nein	Klon 5h	ja	nein
161	26	25	17.09.1997	RSW	C. dub.	10 ³	grün	rau	PM+/CS++	7147140015	nein	Klon 5h	ja	nein
162	26	26	22.10.1997	RSW	C. dub.	10 ²⁻³	grün	rau	PM+/CS++	7147340015	nein	Klon 5h	-	-
163	26	27	19.11.1997	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS++	7147340015	nein	Klon 5j	-	-
164	26	28	17.12.1997	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5h	ja	nein
165	26	29	14.01.1998	RSW	C. dub.	10 ²⁻³	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5h	ja	nein
166	26	30	02.04.1998	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 5c	ja	nein
167	26	31	13.05.1998	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5h	-	-
168	26	32	25.08.1998	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	-	ja	nein
169	26	33	14.04.1998	RSW	-	-	-	-	-	-	-	Klon 5h	ja	nein

Nr.	Pat.	Probe	Datum	Art der Probe	PCR	KBE/ml	CHROMagar Candida®	Staibagar	Reisagar	API® ID 32 C	C. dub.-typisch	Cd25	42°C	45°C
170	26	34	22.09.1998	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	-	ja	nein
171	26	35	30.09.1998	RSW	C. dub.	50	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 5d	ja	nein
172	26	36	27.10.1998	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2aa	ja	nein
173	26	37	17.11.1998	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 2aa	ja	nein
174	26	38	08.12.1998	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS++	7147340015	nein	Klon 5d	ja	nein
175	26	39	12.01.1999	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 5d	ja	nein
176	26	40	16.02.1999	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	-	ja	nein
177	26	41	23.02.1999	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	-	-	-
178	27	1	19.12.1994	RSW	C. dub.	100	grün	-	PM+/CS+	7142100015	ja	-	-	-
179	27	2	16.01.1995	RSW	C. dub.	10	grün	glatt	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 1c	ja	ja
180	27	4	19.06.1995	RSW	C. dub.	100	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5k	ja	nein
181	27	5	11.01.1996	RSW	C. dub.	10	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7142100015	ja	Klon 1b	ja	nein
182	27	6	11.04.1996	RSW	C. dub.	20	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 1b	-	-
183	27	7	13.06.1996	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 1b	ja	nein
184	27	8	18.02.1997	RSW	C. dub.	100	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 1b	-	-
185	27	9	19.11.1997	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 1b	ja	nein
186	27	10	17.12.1997	RSW	C. dub.	20	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5k	-	-
187	27	11	12.02.1998 I	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+/Triplets	7142140015	ja	Klon 5l	ja	nein
188	27	12	12.02.1998 II	RSW	-	-	-	-	-	-	-	Klon 5k	ja	nein
189	27	13	12.02.1998 III	RSW	-	-	-	-	-	-	-	Klon 1b	-	-
190	27	14	14.04.1998 I	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+/Triplets	7142140015	ja	Klon 1b	-	-
191	27	15	14.04.1998 II	RSW	-	-	-	-	-	-	-	Klon 1c	ja	nein
192	27	16	15.07.1998 I	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+/Triplets	7142140015	ja	Klon 5k	-	-
193	27	17	15.07.1998 II	RSW	-	-	-	-	-	-	-	Klon 1b	-	-
194	27	18	20.01.1999	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS++/Triplets	7142140015	ja	Klon 1b	ja	nein
195	27	19	20.07.1999	RSW	C. dub.	-	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7142100015	ja	Klon 5l	ja	nein
196	27	20	12.11.1999	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 5k	ja	nein
197	27	21	03.02.2000	RSW	C. dub.	100	dunkelgrün	rau	PM (kurz+)/CS++/Duplets	7142140015	ja	Klon 5k	ja	nein
198	27	22	23.07.2001	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7147340015	nein	Klon 5k	ja	ja
199	27	23	15.10.2001	RSW	C. dub.	10	grün	rau	PM+/CS+	7142140011	ja	Klon 5k	-	-
200	28	3a	19.12.1993	RSW	-	-	-	-	-	-	-	Klon 6e	-	-
201	28	8	27.06.1994	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6h	ja	nein
202	28	9a	25.07.1994	RSW	C. dub.	Rasen	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6d	ja	nein
203	28	14	12.06.1995	RSW	C. dub.	10 ³	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6c	-	-
204	28	15	16.10.1995	RSW	C. dub.	10 ³	grün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6c	-	-
205	29	1	24.01.1995	BK	C. dub.	-	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2m	ja	nein

Nr.	Pat.	Probe	Datum	Art der Probe	PCR	KBE/ml	CHROMagar Candida®	Staibagar	Reisagar	API® ID 32 C	C. dub.-typisch	Cd25	42°C	45°C
206	29	2	02.07.1998	RSW	C. dub.	-	dunkelgrün	rau	-	7142140015	ja	Klon 2m	ja	nein
207	31	1	03.04.1995	RSW	C. dub.	10 ²⁻³	grün	-	PM+/CS+	7347140015	nein	-	-	-
208	33	1	21.09.1995	RSW	C. dub.	10 ³	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2n	ja	nein
209	33	3	01.02.1996	RSW	C. dub.	10 ³	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 2n	ja	nein
210	33	5	18.07.1996	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	-	PM+/CS+	7142100015	ja	Klon 2n	-	-
211	33	7	22.10.1996	RSW	C. dub.	10 ³	grün	-	PM+/CS++	7142100015	ja	Klon 2y	-	-
212	33	8	06.02.1997	RSW	C. dub.	10 ⁴	grün	-	PM+/CS+	7147350015	nein	Klon 2n	-	-
213	38	2	13.10.1998	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6a	ja	nein
214	38	3	17.02.1999	RSW	C. dub.	100	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6f	ja	nein
215	38	4	11.03.1999	RSW	C. dub.	10 ²⁻³	grün	rau	PM+/CS++	7142140015	ja	Klon 6b	ja	nein
216	38	5	26.03.1999	RSW	C. dub.	Rasen	dunkelgrün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6f	ja	nein
217	38	8	29.04.1999	RSW	C. dub.	Rasen	grün	rau	PM+/CS+	7147340015	nein	Klon 6a	ja	nein
218	38	9	11.05.1999	RSW	C. dub.	10 ³	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6a	ja	nein
219	38	10	22.06.1999	RSW	C. dub.	10 ³	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6a	ja	nein
220	38	11	13.07.1999	RSW	C. dub.	10 ²⁻³	grün	rau	PM+/CS++	7147340015	nein	Klon 6a	ja	nein
221	38	12	05.11.1999	RSW	C. dub.	100	dunkelgrün	-	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6a	ja	nein
222	38	13	10.03.2000	RSW	C. dub.	Rasen	grün	rau	PM+/CS+	7142140015	ja	Klon 6a	ja	nein

8.5 Klinische Merkmale der *C. dubliniensis*-Isolate

Ein „Minus“ bedeutet, dass keine Angabe vorliegt.

Tabelle 15. Patient 1

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4- Zellen
1-C	04.11.1994	10	keine	-	Klon 2p	0,09	0,02	nein	keine	keine	keine	-	-
1-D	09.02.1995	100	keine	-	Klon 2a	-		nein	keine	keine	keine	-	30.3. 496/µl
1-E	18.09.1995	10-100	keine	-	Klon 2p	0,25	</= 0,125	nein	keine	keine	keine	-	311/µl
1-F	16.11.1995	10-100	keine	-	Klon 2p	</= 0,125	</= 0,125	nein	keine	keine	keine	20.5. 83.000 cop/ml	316/µl
1-H	04.09.1996	100	keine	-	Klon 2p	0,39	0,09	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid	23.10. 12.000 cop/ml	23.10. 449/µl
1-I	31.03.1997	100	keine	-	Klon 2p	</= 0,125	</= 0,125	nein	Enanthem	keine	Retrovir, Hivid, Crixivan	27.1. 15.000 cop/ml	-
1-K	17.09.1997	100	keine	-	Klon 2p	0,39	0,09	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid, Crixivan	< 800 cop/ml	592/µl
1-L	10.12.1997	10	<i>C. albicans</i>	10	Klon 2p	0,09	0,39	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid, Crixivan	-	471/µl
1-N	12.02.1998	100	keine	-	Klon 2p	0,39	0,39	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid, Crixivan	190 cop/ml	557/µl
1-O	11.03.1998	1	keine	-	Klon 2a	0,39	0,39	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid, Crixivan	-	-
1-P	06.05.1998	100	keine	-	Klon 2p	0,39	0,09	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid, Crixivan	-	544/µl
1-Q	25.11.1998	100	keine	-	Klon 2a	0,09	< 0,02	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid, Crixivan	5.600 cop/ml	550/µl
1-R	01.12.1998	100	keine	-	Klon 2a	0,09	< 0,02	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid, Crixivan	19.000 cop/ml	318/µl
1-S	23.02.1999	10-100	keine	-	Klon 2a	0,09	0,39	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid, Crixivan	28.000 cop/ml	763/µl
1-T	26.10.1999	10	keine	-	Klon 9	0,25	</= 0,125	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid, Crixivan	40.900 cop/ml	595/µl
1-U	16.03.2000	10	keine	-	Klon 2b	0,09	0,09	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid, Crixivan	62.200 cop/ml	6.1. 733/µl
1-V	16.05.2000	10	keine	-	Klon 2a	<0,02	< 0,02	nein	keine	keine	Zerit, Crixivan, Fortovase	26.300 cop/ml	653/µl

Tabelle 16. Patient 2

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
2-A1	31.08.1990	100	keine	-	Klon 2v	0,5	</= 0,125	-	-	-	-	-	05/90: 42/µl
2-D	20.02.1991	500	keine	-	Klon 2u	0,625	0,039	-	-	-	-	-	-
2-E	27.03.1991	10 ³	keine	-	Klon 2u	0,625	0,039	-	-	-	-	-	-
2-F	24.04.1991	10 ³	keine	-	Klon 2v	0,625	0,019	-	-	-	-	-	-
2-F1	31.05.1991	10 ⁴	<i>C. glabrata</i>	-	Klon 2v	0,25	</= 0,125	-	-	-	-	-	-

Tabelle 17. Patient 3

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
3-E	29.07.1994	10 ²⁻³	keine	-	Klon 2ab	-	-	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	keine	-	31/µl
3-F	22.09.1994	10	<i>C. inconspicua</i>	40	Klon 2ab	</= 0,125	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	keine	-	15.8. 24/µl
3-G	22.12.1994	10 ²⁻³	<i>C. krusei</i>	10	Klon 2ab	0,39	1,56	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	keine	-	25/µl
3-H	26.01.1995	100	<i>C. krusei</i>	10-100	Klon 2ab	0,25	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	keine	-	20/µl

Tabelle 18. Patientin 4

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
4-A	29.06.1995	10 ⁴	<i>C. glabrata</i>	100	Klon 2q	0,39	0,19	ja	keine	-	-	-	-

Tabelle 19. Patientin 5

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
5-A	12.04.1995	10 ³	<i>C. tropicalis</i>	100	Klon 7	0,39	0,09	nein	-	-	-	-	-

Tabelle 20. Patient 6

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
6-F	01.12.1994	100	keine	-	Klon 3a	1,56	0,048	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid	-	75/µl
6-H	02.02.1995	100	keine	-	Klon 3b	-	-	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag wg. Haut und Nägeln	Hivid, Retrovir	-	-
6-I	02.03.1995	100	keine	-	Klon 3a	-	-	nein	keine	keine	Hivid, Retrovir	-	84/µl
6-J	06.04.1995	10	keine	-	Klon 3a	-	-	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Hivid, Retrovir	-	-
6-K	28.11.1995	100	keine	-	Klon 3b	4	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	keine	-	16/µl
6-L	03.06.1996	10	keine	-	Klon 3b	4	</= 0,125	nein	keine	keine	Epivir	-	48µl
6-M	02.04.1997	10 ³	keine	-	Klon 3b	2	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Epivir, Retrovir	240.000 cop/ml	72/µl
6-N	20.05.1997	100	keine	-	Klon 3b	8	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Epivir, Retrovir	-	-
6-T	05.07.2002	Rasen	keine	-	Klon 3b	1	0,5	Soor im Rachen	keine	keine	Invirase, Norvir, Videx, Viramune	-	209/µl

Tabelle 21. Patient 7

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
7-A	28.11.1995	100	<i>C. glabrata</i>	100	Klon 5h	0,09	0,39	nein	keine	keine	keine	-	21.12. 288/µl
7-B	19.02.1996	100	keine	-	Klon 5h	</= 0,125	</= 0,125	nein	keine	keine	keine	48.000 cop/ml	-

Tabelle 22. Patient 8

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
8-A	19.11.1990	-	keine	-	Klon 4c	</= 0,125	</= 0,125	rezidivierende <i>Candida</i> -Infektionen 90/91, jetzt unbekannt	-	-	Retrovir	-	-

Tabelle 23. Patient 9

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
9-B	22.08.1994	100	<i>C. glabrata</i>	200	Klon 4a	-	-	nein	Enanthem	Fluconazol 100 mg/Tag	keine	-	9/µl
9-E	13.10.1994	100	<i>C. glabrata</i>	10 ³	Klon 4a	-	-	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	keine	-	0/µl
9-F	03.11.1994	10 ³	<i>C. glabrata</i>	10 ³⁻⁴	Klon 4a	0,78	0,09	ja	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	keine	-	2/µl

Tabelle 24. Patientin 10

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
10-1	28.08.1989	-	keine	-	Klon 2c	0,39	0,78	nein	Schluckbeschwerden	keine	keine	-	12.12. 20/µl
10-4	04.07.1990	-	<i>C. glabrata</i>	-	Klon 2c	0,78	1,56	nein	keine	Fluconazol 100 mg für 5 Tage	keine	-	25.5. 20/µl
10-5b	30.07.1990	-	keine	-	Klon 2c	2	0,25	nein	keine	keine	keine	-	-
10-7	10.09.1990	10 ⁴	<i>C. glabrata</i>	-	Klon 2c	< 40	0,78	nein	keine	Fluconazol 100 mg	keine	-	20/µl

Tabelle 25. Patientin 11

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
11-1	20.12.1993	20	keine	-	Klon 2t	0,25	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol 3x/Wo seit 19.8.	Videx	-	210/µl
11-2	15.09.1994	10	keine	-	-	-	-	nein	keine	Fluconazol 100/Tag, Clotrimazolsalbe vaginal	Videx	-	255/µl
11-3	13.10.1994	100	keine	-	Klon 2t	-	-	nein	keine	Fluconazol 100/Tag, Clotrimazolsalbe vaginal	Videx	-	-
11-4	10.11.1994	40	keine	-	kein Bandenmuster	0,19	0,048	nein	keine	Fluconazol 100/Tag, Clotrimazolsalbe vaginal	Videx	-	290/µl
11-5	02.02.1995	30	keine	-	Klon 2t	1	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol-Prophylaxe ab, jetzt Ketoconazol wg. Vaginalsoor	Videx	-	234/µl
11-6	06.11.1995	200	keine	-	Klon 2i	1	</= 0,125	nein	keine	Ketoconazol mit Pausen	keine	-	116/µl
11-7	22.01.1996	140	keine	-	-	-	-	nein	keine		Zerit, Invirase	-	128/µl
11-8	05.02.1996	10	keine	-	Klon 2t	1	</= 0,125	nein	belegte Zunge	keine	Zerit, Invirase	-	-

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
11-9	04.03.1996	10	keine	-	Klon 2t	1	</= 0,125	nein	keine	keine	Zerit, Invirase	-	202/µl
11-10	01.04.1996	10	keine	-	Klon 2t	-		nein	keine	keine	Zerit, Invirase	< 400 cop/µl	-
11-11	30.05.1996	40	keine	-	Klon 2t	1	</= 0,125	nein	keine	keine	Zerit, Invirase	-	29.4. 179/µl
11-12	27.06.1996	40	keine	-	Klon 2t	0,09	0,09	nein	keine	keine	Zerit, Invirase	-	-
11-13	19.08.1996	10	keine	-	Klon 2i	0,39	0,39	nein	belegte Zunge	keine	Zerit, Invirase	-	22.7. 213/µl
11-14	17.09.1996	10	keine	-	Klon 2t	1	</= 0,125	nein	keine	keine	Zerit, Invirase	-	218/µl
11-15	15.10.1996	10	keine	-	Klon 2i	0,39	0,39	nein	keine	keine	Zerit, Invirase	< Messbereich	10.12. 227/µl
11-16	28.04.1997	10	keine	-	Klon 2t	0,39	0,09	nein	keine	keine	Zerit, Invirase	-	258/µl
11-17	18.06.1997	10	keine	-	Klon 2i	0,39	0,39	nein	Sodbrennen	keine	Zerit, Invirase	< Messbereich	16.7. 260/µl
11-22	11.03.1998	300	keine	-	Klon 2t	0,39	0,39	nein	keine	keine	Zerit, Epivir, Crixivane	-	416/µl
11-23	15.07.1998	40	keine	-	Klon 2t	0,5	</= 0,125	nein	keine	keine	Zerit, Epivir, Crixivane	< 89 cop/ml	333/µl
11-25	16.09.1998	10-100	keine	-	Klon 2i	0,09	0,09	nein	keine	keine	Zerit, Epivir, Crixivane	6.10. < 80 cop/ml	313/µl
11-26	03.11.1998	100	keine	-	Klon 2j	0,39	< 0,02	nein	keine	keine	Zerit, Epivir	78.000 cop/ml	356/µl
11-27	01.12.1998	30	keine	-	Klon 2i	0,09	0,09	nein	keine	keine	Zerit, Epivir, Videx, Viramune	-	367/µl
11-28	05.01.1999	40	keine	-	Klon 2t	0,39	0,09	nein	keine	keine	Zerit, Epivir, Viramune	-	-
11-29a	02.03.1999	100-170	keine	-	Klon 2t	0,09	0,39	nein	keine	keine	Zerit, Epivir, Viramune	-	2.2. 338/µl
11-30	13.04.1999	100	<i>C. glabrata</i>	100	Klon 2i	0,25	</= 0,125	nein	keine	keine	Zerit, Epivir, Viramune	< 50 cop/ml	365/µl
11-31	11.05.1999	10	keine	-	Klon 2i	0,25	</= 0,125	nein	keine	Keine	Zerit, Epivir, Viramune	-	-
11-32	13.07.1999	10	keine	-	Klon 2i	0,5	1	nein	keine	keine	Zerit, Epivir, Viramune	< 50 cop/ml	516/µl
11-34	11.01.2000	10	<i>C. glabrata</i>	100	Klon 2k	0,25	</= 0,125	nein	keine	keine	Zerit, Epivir, Viramune	< 50 cop/ml	505/µl
11-36	05.04.2000	10	keine	-	Klon 2l	0,5	</= 0,125	nein	keine	keine	Zerit, Epivir, Viramune	-	564/µl

Tabelle 26. Patient 13

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
13-1	17.10.1990	210	keine	-	Klon 1a	0,78	6,25	-	-	-	keine	-	-

Tabelle 27. Patient 14

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
14-3	20.02.1995	10 ³	keine	-	Klon 2d	0,25	</= 0,125	nein	Enanthem, belegte Zunge	nein	keine	-	335/µl
14-10	24.07.1996	10 ⁴⁻⁵	<i>C. glabrata</i>	10 ³	Klon 2w	0,39	0,09	nein	Zunge belegt	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Retrovir, Epivir	-	24.6. 386/µl
14-13	17.02.1997	10 ³	keine	-	Klon 2d	0,39	0,39	etwas	Enanthem, Schluckbeschwerden	nein	Retrovir, Epivir	-	-
14-14	24.02.1997	100	keine	-	Klon 2d	0,39	1,56	nein	Enanthem	nein	Retrovir, Epivir	-	-
14-16	18.06.1997	100	keine	-	Klon 2d	0,39	0,39	nein	keine	nein	Retrovir, Epivir	-	-
14-17	17.09.1997	-	keine	-	Klon 2d	0,39	0,09	nein	Rachen Enanthem	nein	Retrovir, Epivir	< 0,8 cop/ml	515/µl
14-18	17.12.1997	10 ³	<i>C. glabrata</i>	10 ²⁻³	Klon 2x	0,39	0,39	nein	keine	nein	Retrovir, Epivir	-	350/µl
14-19	19.02.1998	10-100	<i>C. albicans</i>	100	Klon 2d	0,39	1,56	nein	keine	nein	Retrovir, Epivir	390 cop/ml	403/µl
14-22	08.07.1998	100	<i>C. glabrata</i>	100	Klon 2d	0,39	0,39	nein	keine	nein	Combivir	12.5. < 800 cop/ml	488/µl
14-24	03.11.1998	100	<i>C. glabrata</i>	10-100	Klon 2w	0,5	</= 0,125	nein	Zunge belegt	nein	Combivir	< 800 cop/ml	605/µl
14-25	15.04.1999	100	<i>C. glabrata</i>	100	Klon 2d	0,25	</= 0,125	nein	keine	nein	Combivir	800 cop/ml	449/µl
14-27	29.06.1999	100	<i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i>	20	Klon 2d	0,5	</= 0,125	nein	keine	nein	Combivir	-	-
14-28	12.10.1999	100	<i>C. glabrata</i>	10	Klon 2d	0,5	</= 0,125	nein	keine	nein	Combivir	90 cop/ml	659/µl
14-29	24.02.2000	100	<i>C. glabrata</i>	10 ³	Klon 2d	0,09	0,09	nein	keine	nein	Combivir	60 cop/ml	622/µl
14-31	10.09.2001	10-100	<i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i>	10-100	Klon 2d	0,39	0,39	nein	keine	nein	Combivir	< 50 cop/ml	472/µl

Tabelle 28. Patient 15

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
15-4	05.05.1994	10	keine	-	-	-	-	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Wo seit 02/94	keine	-	3.2. 216/µl
15-5	02.06.1994	10	keine	-	-	-	-	nein	keine	keine	keine	-	128/µl
15-6	12.07.1994	10-100	keine	-	-	-	-	nein	keine	keine	keine	-	167/µl
15-9	15.09.1994	100	keine	-	-	-	-	nein	keine	keine	keine	-	155/µl
15-18	19.12.1995	100	<i>C. lambica</i>	100	Klon 2i	0,5	</= 0,125	nein	Dysphagie, V. a. Soorösophagitis	keine	keine	-	20.11. 36/µl

Tabelle 29. Patientin 16

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
16-1	10.06.1998	10 ³⁻³	keine	-	Klon 2e	0,39	0,09	nein	keine	Voriconazol 500 mg 10.6.-23.6. iv., dann 400 mg p.o.	-	-	-
16-2	17.06.1998	10	keine	-	Klon 2f	0,39	0,09	nein	keine	Keine	-	-	-
16-4	29.09.1998	10-100	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i>	100	Klon 2e	0,09	< 0,02	nein	keine	keine	-	-	-
16-6	01.12.1998	100	<i>C. albicans</i>	10 ²⁻³	Klon 2f	0,09	< 0,02	nein	keine	keine	-	-	-

Tabelle 30. Patient 17

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
17-4	30.05.1994	100	<i>C. glabrata</i>	-	Klon 2g	-	-	nein	Enanthern, belegte Zunge	Fluconazol 100 mg/Wo	Retrovir, Hivid	-	2.5. 74/µl
17-5	27.10.1994	10 ⁴	<i>C. glabrata</i>	10 ³	Klon 2g	0,19	50	gering	keine	keine	Retrovir	-	29.9. 32/µl

Tabelle 31. Patient 18

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
18-1	02.11.1995	20	keine	-	Klon 4b	0,25	0,25	nein	keine	aktuell keine, aber vorbehandelt	Retrovir, Eпивir	-	-
18-2	09.11.1995	20	keine	-	Klon 6g	0,5	<= 0,125	nein	keine	keine	Retrovir, Eпивir	-	56/µl

Tabelle 32. Patientin 19

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
19-1	12.04.1995	400	<i>C. glabrata</i>	10	Klon 2z	0,09	0,09	nein	keine	keine	-	-	-

Tabelle 33. Patient 21

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
21-1	08.05.1991	2x10 ³	keine	-	Klon 5f	0,39	0,39	nein	keine	keine	Retrovir	-	6.6. 67/µl
21-2	03.07.1991	10 ³	keine	-	Klon 5e	0,78	0,78	nein	keine	keine	Retrovir	-	14.8. 27/µl
21-3	17.05.1993	-	keine	-	Klon 5f	0,09	0,09	nein	Stomatitis, Enanthern Rachen	keine	Retrovir, Hivid	-	14.6. 14/µl
21-4	06.09.1993	20	keine	-	Klon 5f	0,39	0,09	nein	keine	keine	keine	-	9.8. 13/µl
21-5	09.11.1993	100	keine	-	Klon 5e	0,39	0,39	nein	keine	keine	Videx	-	-
21-6	06.12.1993	60	keine	-	Klon 5f	0,39	0,39	nein	keine	keine	Videx	-	12/µl

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
21-13	09.05.1994	10 ³	<i>C. albicans</i>	10 ³	Klon 5f	0,39	0,39	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	Videx	-	28.2. 4/µl
21-15	30.05.1994	Rasen	<i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i>	10 ³	Klon 5f	0,39	0,39	nein	gering Enanthem	Fluconazol 100 mg/2 Tage	Videx	-	4/µl
21-16	16.06.1994	10 ³	<i>C. krusei</i>	10 ³	Klon 5f	0,39	0,39	nein	keine	keine	Videx	-	-
21-17	11.07.1994	10 ⁴	<i>C. krusei</i>	10 ⁴	Klon 5f	0,39	0,09	etwas	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	Videx	-	-
21-20	08.08.1994	10 ⁴	<i>C. krusei</i> , <i>C. albicans</i>	10 ⁴	Klon 5f	0,39	0,39	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	Videx	-	-
21-21	19.09.1994	2x10 ³	<i>C. krusei</i>	10 ³	Klon 5f	0,39	0,39	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	Videx	-	-
21-23	24.10.1994	10 ³	<i>C. krusei</i>	100	Klon 5f	6,25	0,39	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	Videx	-	-
21-24	07.11.1994	10 ²⁻³	<i>C. krusei</i>	100	Klon 5f	6,25	0,39	nein	Enanthem	Fluconazol 100 mg/Tag	Videx	-	4µl
21-25	21.11.1994	100	<i>C. krusei</i> , <i>C. albicans</i>	100	Klon 5f	1,56	0,39	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	Videx	-	-
21-28	19.12.1994	10 ⁴	<i>C. krusei</i>	100	Klon 5f	25	1,56	nein	keine	Fluconazol 100 mg/2 Tage	Videx	-	16.1. 2/µl

Tabelle 34. Patient 22

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	Mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
22-8	30.05.1996	100	keine	-	Klon 5a	</= 0,125	</= 0,125	nein	keine	keine	Retrovir, Zerit	-	-
22-9	27.06.1996	50	keine	-	Klon 5a	0,09	0,09	nein	keine	keine	keine	< Messbereich	176/µl
22-10	27.08.1997	10 ³⁻⁴	keine	-	Klon 5a	0,39	0,09	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Norvir	25.6. 7.200 cop/ml	181/µl
22-11	24.09.1997	10 ²⁻³	keine	-	Klon 5a	0,39	0,09	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	-	97/µl
22-12	29.10.1997	10 ²⁻³	keine	-	Klon 8	0,09	0,39	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	1.300 cop/ml	196/µl
22-14	25.05.1998	100	<i>C. albicans</i>	100	Klon 5a	0,39	0,39	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	-	-
22-15	04.06.1998	30	<i>C. lambica</i>	10	Klon 5i	</= 0,125	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Wo	Retrovir, Epivir, Crixivan	-	109/µl
22-17	02.09.1998	100	keine	-	Klon 5a	0,09	0,09	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	-	-
22-20	11.06.1999	250	<i>C. albicans</i>	500	Klon 5a	</= 0,125	</= 0,125	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	-	-
22-21	29.07.1999	100	keine	-	Klon 5a	</= 0,125	</= 0,125	nein	keine	keine	Combivir, Viramune	-	129/µl
22-22	22.10.1999	500	keine	-	Klon 5a	0,25	</= 0,125	nein	keine	keine	Videx, Fortovase, Norvir, Zerit, Viramune	< 50 cop/ml	321/µl

Tabelle 35. Patientin 23

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
23-1	21.08.1997	10-100	<i>C. krusei</i>	10 ³	Klon 2s	0,09	0,02	nein	-	Amphotericin B seit 13.8.	-	-	-

Tabelle 36. Patientin 24

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
24-1b	07.06.1995	100	<i>C. tropicalis, C. glabrata, C. albicans</i>	-	Klon 2r	0,25	</= 0,125	-	-	-	-	-	-

Tabelle 37. Patient 25

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
25-2	28.11.1994	10 ⁴	<i>C. glabrata</i>	10 ⁵	Klon 2w	2	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	keine	-	24.10. 76/µl
25-2a	12.12.1994	10 ⁴	<i>C. glabrata</i>	10 ⁵	-	3,25	0,09	nein	keine	keine	keine	-	-
25-2b	19.12.1994	10 ³	<i>C. glabrata</i>	10 ⁴	-	3,25	0,78	nein	keine	Fluconazol 100 mg/2 Tage	keine	-	-
25-3	02.01.1995	10 ⁴	<i>C. glabrata</i>	10 ⁵	Klon 2w	3,25	3,25	nein	keine	keine	keine	-	7/µl
25-4	06.02.1995	10 ³	<i>C. glabrata</i>	10 ³	Klon 2h	2	</= 0,125	nein	Zunge belegt	Fluconazol 2x/Wo	keine	-	7/µl
25-5	06.03.1995	10 ⁴	<i>C. glabrata</i>	10 ⁴	Klon 2h	2	</= 0,125	nein	keine	keine	keine	-	-

Tabelle 38. Patient 26

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4- Zellen
26-2	22.05.1995	100	keine	-	Klon 5g	0,5	</= 0,125	nein	keine	aktuell keine, aber vortherapiert	Zerit	-	-
26-3	17.07.1995	100	keine	-	Klon 5g	8	1	nein	keine	keine	Zerit	-	239/µl
26-4	11.09.1995	10-100	keine	-	Klon 5c	-	-	rückläufig	keine	keine	Zerit	-	-
26-6	02.10.1995	10	keine	-	Klon 5c	0,39	0,39	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Wo	Zerit	-	343/µl
26-7	30.10.1995	10	keine	-	Klon 5b	0,5	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag für 10 Tage	Zerit	-	195/µl
26-9	28.11.1995	10	keine	-	Klon 5g	0,5	</= 0,125	nein	keine	Pause	Videx, Crixivan	-	-
26-10	19.12.1995	10	keine	-	Klon 5b	0,39	1,56	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Videx, Crixivan	-	233/µl
26-11	29.01.1996	10	keine	-	Klon 5c	0,25	0,25	nein	keine	keine	Videx	-	181/µl
26-13	20.05.1996	10	keine	-	Klon 5g	0,5	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag für 10 Tage	Videx	250.000 cop/ml	234/µl
26-14	17.06.1996	10	keine	-	Klon 5c	0,5	0,25	nein	juckendes Exanthem an den Mundwinkeln	Fluconazol mg/Wo	Videx	-	238/µl
26-15	08.07.1996	10	keine	-	Klon 5c	0,39	0,09	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Wo	Videx	920.000 cop/ml	-
26-16	09.09.1996	100	keine	-	Klon 5g	0,5	</= 0,125	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Wo	Videx, Norvir	-	200/µl

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4- Zellen
26-17	07.10.1996	100	keine	-	Klon 5d	0,09	0,09	nein	Mund- trockenheit	Fluconazol 100 mg/Wo	Videx	210.000 cop/ml	-
26-18	19.11.1996	10 ⁴	keine	-	Klon 5g	0,5	</= 0,125	nein	Mund- trockenheit	Fluconazol 100 mg/Wo	Eпивir	-	155/µl
26-19	03.03.1997	10	keine	-	Klon 5d	0,5	</= 0,125	nein	keine	keine	Videx, Epivir, Invirase	250 cop/ml	155/µl
26-21	02.05.1997	10	keine	-	Klon 5c	0,39	0,39	nein	keine	keine	Videx, Epivir, Viracept	-	2.4. 165/µl
26-22	28.05.1997	10	keine	-	Klon 5h	0,5	</= 0,125	nein	keine	keine	Videx, Epivir, Viracept	< Messbereich	-
26-23	23.07.1997	100	keine	-	Klon 5h	1	0,5	nein	keine	keine	keine	-	234/µl
26-24	11.08.1997	10 ³	keine	-	Klon 5h	1	</= 0,125	nein	keine	keine	Videx, Epivir, Viracept	140.000 cop/ml	-
26-25	17.09.1997	10 ³	<i>C. krusei</i>	-	Klon 5h	0,39	0,09	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Videx, Epivir, Hivid	-	221/µl
26-26	22.10.1997	10 ²⁻³	keine	-	Klon 5h	0,39	0,39	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Videx, Epivir, Viracept	-	113/µl
26-27	19.11.1997	100	keine	-	Klon 5j	1,56	0,39	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Videx, Epivir, Viracept	< 400 cop/ml	359/µl
26-28	17.12.1997	100	<i>S. cerevisiae</i>	30	Klon 5h	0,39	0,39	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Videx, Epivir, Viracept	-	350/µl
26-29	14.01.1998	10 ²⁻³	<i>S. cerevisiae</i>	10 ²⁻³	Klon 5h	1,56	1,56	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Videx, Epivir, Viracept	< Messbereich	405/µl
26-30	02.04.1998	10 ⁴	keine	-	Klon 5c	0,39	0,39	Stippchen	keine	keine	Videx, Epivir, Viracept	130.000 cop/ml	315/µl
26-31	13.05.1998	100	keine	-	Klon 5h	0,39	0,09	nein	keine	keine	Videx, Epivir, Viracept, Fortovase	103.175 cop/ml	234/µl
26-32	25.08.1998	10	keine	-	-	0,39	0,39	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Epivir, Viramune, Viracept	-	-
26-33	14.04.1998	-	keine	-	Klon 5h	-	-	nein	keine	-	Epivir, Viramune, Viracept	-	-
26-34	22.09.1998	10	keine	-	-	0,39	0,09	nein	keine	-	keine	-	-
26-35	30.09.1998	50	keine	-	Klon 5d	1,56	0,39	nein	keine	-	Epivir	-	-
26-36	27.10.1998	10	keine	-	Klon 2aa	0,39	0,09	nein	keine	-	Epivir	190.000 cop/ml	-
26-37	17.11.1998	10	keine	-	Klon 2aa	0,39	0,09	nein	keine	Fluconazol 100 mg/Tag für 7 Tage	Epivir	-	206/µl
26-38	08.12.1998	100	keine	-	Klon 5d	0,39	0,39	nein	keine	keine	Videx, Invirase, Norvir	-	-
26-39	12.01.1999	10	keine	-	Klon 5d	0,39	0,39	nein	keine	Fluconazol 2x100 mg/Wo	Videx, Invirase, Norvir	180.000 cop/ml	311/µl
26-40	16.02.1999	10	keine	-	-	0,39	0,39	nein	keine	keine	keine	-	374/µl
26-41	23.02.1999	10	keine	-	-	0,39	1,56	nein	keine	keine	Videx, Invirase, Norvir	-	-

Tabelle 39. Patient 27

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
27-1	19.12.1994	100	keine	-	-	0,19	0,39	nein	keine	keine	Retrovir	-	-
27-2	16.01.1995	10	<i>C. albicans</i>	10	Klon 1c	1	0,5	nein	keine	keine	Retrovir	-	305/µl
27-4	19.06.1995	100	<i>C. krusei</i>	20	Klon 5k	0,25	</= 0,125	nein	keine	keine	Retrovir	-	331/µl
27-5	11.01.1996	10	keine	-	Klon 1b	1	0,25	nein	keine	keine	Retrovir	-	268/µl
27-6	11.04.1996	20	keine	-	Klon 1b	-	-	nein	Schluckbeschwerden, Enanthem Rachen	keine	Retrovir	-	230/µl
27-7	13.06.1996	10	keine	-	Klon 1b	0,5	</= 0,125	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid	72.000 cop/ml	296/µl
27-8	18.02.1997	100	<i>C. tropicalis</i>	100	Klon 1b	-	-	nein	keine	keine	Epivir, Retrovir	< Messbereich	254/µl
27-9	19.11.1997	10	<i>C. tropicalis</i>	10	Klon 1b	0,39	0,09	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	6.8. < 800 cop/ml	260/µl
27-10	17.12.1997	20	<i>C. tropicalis</i>	40	Klon 5k	0,39	0,39	nein	Sodbrennen, retrosternale Schmerzen	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	< 800 cop/ml	348/µl
27-11	12.02.98 I	10	keine	-	Klon 5l	0,09	1,56	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	-	458/µl
27-12	12.02.98 II	-	keine	-	Klon 5k	-	-	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	-	-
27-13	12.02.98 III	-	keine	-	Klon 1b	-	-	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	-	-
27-14	14.04.98 I	10	keine	-	Klon 1b	0,39	0,09	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	< 800 cop/ml	289/µl
27-15	14.04.98 II	-	keine	-	Klon 1c	-	-	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	-	-
27-16	15.07.98 I	10	keine	-	Klon 5k	0,09	0,39	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	< 800 cop/ml	429/µl
27-17	15.07.98 II	-	keine	-	Klon 1b	-	-	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	-	-
27-18	20.01.1999	10	keine	-	Klon 1b	0,39	0,039	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Crixivan	-	322/µl
27-19	20.07.1999	-	keine	-	Klon 5l	0,25	</= 0,125	nein	keine	keine	Retrovir, Epivir, Viramune	< 500 cop/ml	200/µl
27-20	12.11.1999	10	keine	-	Klon 5k	0,5	</= 0,125	nein	keine	keine	Combivir, Viramune	420 cop/ml	267/µl
27-21	03.02.2000	100	<i>C. tropicalis</i>	100	Klon 5k	0,25	</= 0,125	nein	keine	keine	Combivir, Viramune	400 cop/ml	113/µl
27-22	23.07.2001	10	keine	-	Klon 5k	0,09	0,09	nein	keine	keine	Combivir, Kaletra	96 cop/ml	376/µl
27-23	15.10.2001	10	keine	-	Klon 5k	0,25	</= 0,125	nein	Sodbrennen	keine	Combivir, Kaletra	< 50 cop/ml	310/µl

Tabelle 40. Patient 28

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
28-3a	19.12.1993	-	keine	-	Klon 6e	-	-	bisher nicht	keine	bisher keine	Retrovir, Hivid	-	7.1. 350/µl
28-8	27.06.1994	10 ⁴	<i>C. glabrata</i>	Rasen	Klon 6h	0,25	</= 0,125	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid	-	198/µl
28-9a	25.07.1994	Rasen	<i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i>	Rasen	Klon 6d	0,5	</= 0,125	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid	-	289/µl
28-14	12.06.1995	10 ³	<i>C. glabrata</i>	10 ⁴	Klon 6c	-	-	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid	-	10.4. 224/µl
28-15	16.10.1995	10 ³	<i>C. glabrata</i>	10 ⁵	Klon 6c	-	-	nein	keine	keine	Retrovir, Hivid	06/96 < Messbereich	173/µl

Tabelle 41. Patientin 29

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
29-1	24.01.1995	-	keine	-	Klon 2m	0,25	</= 0,125	nein	keine	Amphotericin B 24ml/d, Fluconazol 150 mg/Tag	keine	-	-
29-2	02.07.1998	-	-	-	Klon 2m	0,25	</= 0,125	nein	keine	-	-	-	-

Tabelle 42. Patient 31

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
31-1	03.04.1995	10 ²⁻³	<i>C. glabrata</i>	10 ³	-	-	-	bisher nicht	leichtes Erythem	keine	keine	-	13.3. 470/µl

Tabelle 43. Patient 33

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
33-1	21.09.1995	10 ³	<i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i>	10 ³	Klon 2n	0,09	0,39	nein	keine	keine	Retrovir	-	161/µl
33-3	01.02.1996	10 ³	<i>C. glabrata</i>	10 ³	Klon 2n	</= 0,125	</= 0,125	nein	keine	keine	Retrovir	-	18.1. 136/µl
33-5	18.07.1996	10 ⁴	<i>C. glabrata</i>	10 ³	Klon 2n	0,39	0,09	nein	keine	keine	Retrovir	13.6. 10.000 cop/ml	206/µl
33-7	22.10.1996	10 ³	<i>C. glabrata</i>	10 ³	Klon 2y	0,09	0,39	Soor Mundwinkel	keine	Fluconazol 100 mg/Tag	Epivir, Retrovir	24.9. 120.000 cop/ml	24.9. 174/µl
33-8	06.02.1997	10 ⁴	<i>C. glabrata</i>	10 ⁴	Klon 2n	0,09	0,39	nein	keine	keine	Retrovir, Videx, Invirase	16.000 cop/ml	178/µl

Tabelle 44. Patient 38

Probe	Datum	KBE/ml C. dub.	Mischkultur	KBE/ml Mischkultur	Cd25	MHK-Fluco (µg/ml)	MHK-Itra (µg/ml)	Soor	Symptome	mykologische Therapie	HIV-Therapie (®)	Viruslast	CD4-Zellen
38-2	13.10.1998	100	<i>C. glabrata</i>	10	Klon 6a	6,25	0,39	nein	Mundtrockenheit	keine(vortherapiert)	Zerit, Epivir	25.8. 1.900 cop/ml	804/µl
38-3	17.02.1999	100	<i>C. glabrata</i>	10	Klon 6f	6,25	1,56	nein	keine	keine	Zerit, Videx, Viracept	-	-
38-4	11.03.1999	10 ²⁻³	<i>C. glabrata</i>	20	Klon 6b	0,39	1,56	nein	keine	keine	Pause	-	-
38-5	26.03.1999	Rasen	<i>C. glabrata</i>	Rasen	Klon 6f	6,25	6,25	nein	keine	keine	Epivir	-	193/µl
38-8	29.04.1999	Rasen	<i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i>	Rasen	Klon 6a	1	</= 0,125	nein	keine	keine	Epivir	-	-
38-9	11.05.1999	10 ³	<i>C. glabrata</i>	10 ³	Klon 6a	0,5	</= 0,125	nein	keine	keine	Epivir	-	-
38-10	22.06.1999	10 ³	<i>C. glabrata</i>	10 ²⁻³	Klon 6a	1	0,5	nein	keine	keine	Epivir	-	-
38-11	13.07.1999	10 ²⁻³	<i>C. glabrata</i>	100	Klon 6a	0,5	</= 0,125	nein	keine	keine	Zerit, Videx, Viracept, Epivir	-	787/µl
38-12	05.11.1999	100	<i>C. glabrata</i> , <i>Geotrichum Sp.</i>	100	Klon 6a	0,5	</= 0,125	nein	keine	keine	Zerit, Videx, Viracept, Epivir	-	548/µl
38-13	10.03.2000	Rasen	<i>C. glabrata</i>	Rasen	Klon 6a	0,09	0,39	nein	Mundtrockenheit	keine	Zerit, Videx, Norvir, Agenerase, Epivir	-	504/µl

9 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Julia Pasligh, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Untersuchungen zur Epidemiologie von *Candida dubliniensis* unter Verwendung von molekularen und nicht-molekularen Methoden“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 19.05.2008

10 Danksagung

Mein erster Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Markus Ruhnke** für das Bereitstellen des Themas und der Mittel für diese Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei ihm für die Betreuung und die großzügige Hilfestellung insbesondere in den letzten Zügen der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Dr. Michael Fleischacker** und **Frau Clarissa Radecke**, die sich mit größtem Engagement, das weit über die regulären Arbeitszeiten hinausging, für mich und diese Arbeit einsetzten. Mit ihrer Zuversicht und ihrer praktischen Unterstützung halfen sie mir über manche zunächst unüberwindbar scheinende Hürde hinweg. Ganz herzlich möchte ich mich für ihre Freundschaft bedanken, die ich sehr schätze. Vielen Dank auch an das restliche **Team der AG Prof. Ruhnke** und an die **benachbarten Laborteams**.

Vielen Dank an **Herrn Dr. Gary Moran** aus der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. David Coleman für das Bereitstellen der Phagensuspension und die technische Unterstützung bei der Phagenpräparation.

Frau Dr. Kathrin Tintelnot und **Frau Antweiler** aus dem Robert-Koch Institut danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der API®-Codes

Herrn Dr. Robert Jäger von der Firma BioSciTec möchte ich für die Hilfsbereitschaft und das Engagement beim Lösen jedweder Software-Probleme danken, sowie für die Bereitstellung der Zusatzprogramme.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern **Ursula und Heinrich Pasligh**, die mich über die ganze Zeit in jeder erdenklichen Hinsicht unterstützten und immer hinter mir standen. Ebenso danke ich meinen Geschwistern **Sandra, Britta und Martin Pasligh** und **meinen Freunden** für die Geduld und die Großzügigkeit, mit der sie mich begleiteten.