

Resistenzbestimmungen in der Mykologie

127

Wert und Grenzen routinemäßiger vergleichender Diffusionsteste

Resistance determinations in mycology

97

Values and limits of routine comparative diffusion tests

K. LIESKE, Christine LIESKE und M. REFAI, Hamburg*), Cairo**)

Zusammenfassung

Routinemäßige Resistenzbestimmungen mit Hefepilzen im Blättchentest mit Bewertung der Hemmhofdurchmesser sind ungeeignet, um zuverlässige Aussagen über die Eignung der miteinander verglichenen Wirkstoffe als Therapeutikum zu machen. Hochwirksame Antimykotika, die ein großes Molekül aufweisen, diffundieren nur langsam, ergeben damit relativ kleine Hemmhöfe und würden falsch bewertet.

Am Beispiel des Natamycin (Pimaricin) wird aufgezeigt, wie dieses antibiotische Antimykotikum aus *Streptomyces natalensis* die Zellen von *Candida albicans* zerstört und auflöst.

Summary

Routine resistance assays can be performed with yeasts by using the paper disc test and measuring the diameters of the inhibition zones; results obtained from these tests cannot, however, be employed as reliable criteria for establishing the suitability of comparable antimycotics as therapeutic agents. Highly effective antimycotics which are composed of large molecules can only diffuse slowly, they thus produce relatively small inhibition zones and would be wrongly assessed.

Natamycin (pimaricin) is used as an example to show how this antibiotic antimycotic agent from *Streptomyces natalensis* destroys and breaks up the cells of *Candida albicans*.

Einleitung

Resistenzbestimmungen sind in der Bakteriologie weit verbreitet. Sie dienen dem Zweck, unter den verfügbaren antibakteriellen Arzneimitteln eine Unterscheidung zwischen geeigneten und ungeeig-

neten zu treffen. Meist wird die Eignung der miteinander verglichenen Stoffe graduiert, z. B. +, ++ und +++.

Üblich ist die Anwendung eines Blättchentests, bei dem die zu testenden Wirkstoffe rund um das Blättchen in den festen Nährboden diffundieren. Der Durchmesser der gegebenenfalls auftretenden Hemmhöfe gilt als Maß für die vergleichende Bewertung.

Analog zu diesen Resistenzbestimmungen wird nun auch auf dem

*) Dr. med. Klaus Lieske, Christine Lieske, Wiesendamm 142, D-2000 Hamburg 60
**) Prof. Dr. Mohamed Refai, Department of Microbiology, Faculty of Vet. Med., Cairo University, Giza, Egypt

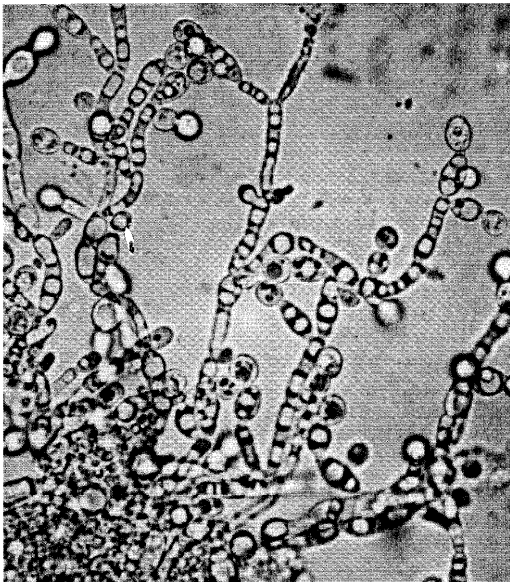


Abb. 1: Zebrastraffung des Pseudomyzels von *Candida albicans* infolge Vakuolisierung durch geringe Mengen Natamycin

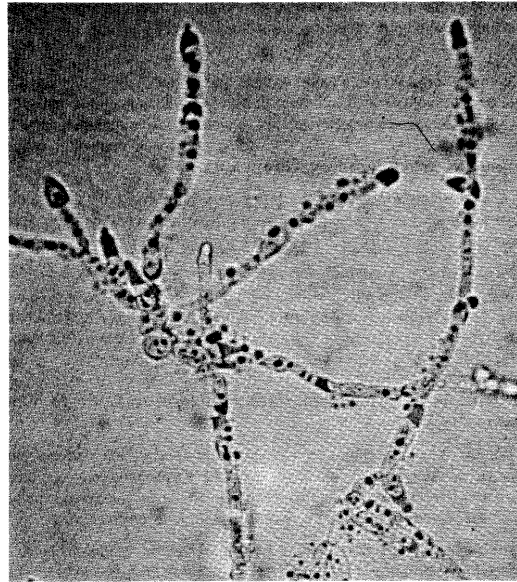


Abb. 2: Verkümmern und Verformung des Pseudomyzels und der Chlamydosporen von *Candida albicans* durch Natamycin

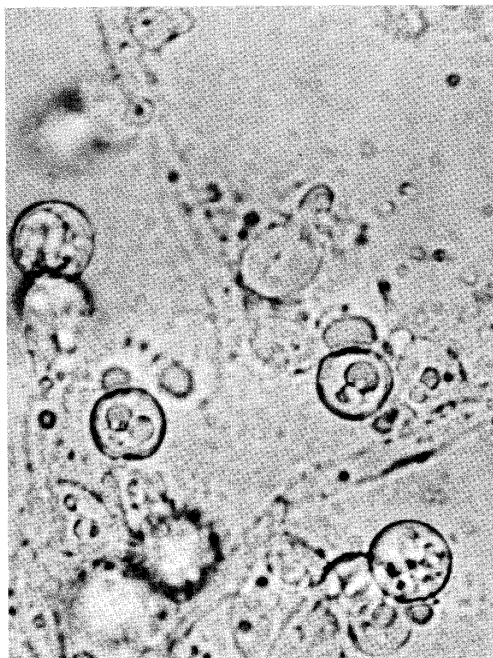


Abb. 3: Weitgehende Auflösung des Pseudomyzels und pathologische Vakuolisierung der Chlamydosporen von *Candida albicans* durch Natamycin

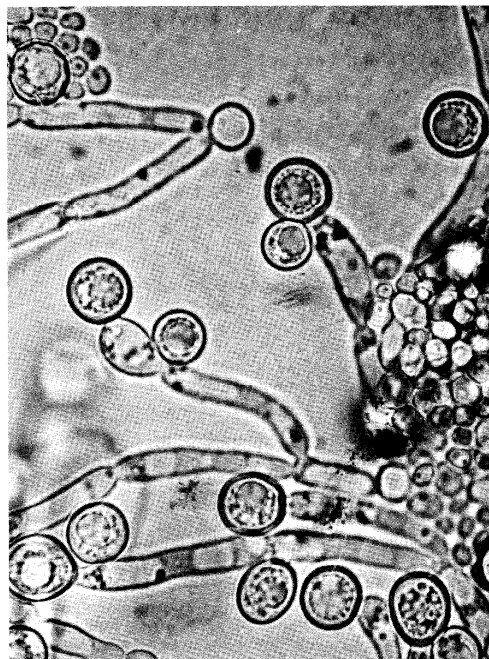


Abb. 4: Kontrollaufnahme von *Candida albicans* auf Reisagar ohne Natamycinzusatz. Typisch sind das Pseudomyzel und die Chlamydosporen

Gebiet der medizinischen Mykologie erwartet, daß solche vergleichenden Diffusionsteste mit den aus dem eingesandten Material isolierten Pilzen durchgeführt werden.

Dies betrifft insbesondere Hefepilze, wie z. B. *Candida albicans*, und mit Recht wird die Frage gestellt, welchen Wert das Ergebnis eines solchen Diffusionstestes für den Material einsendenden Arzt hat und wo die Grenzen derartiger Resistenzbestimmungen liegen.

Fungistatische und fungizide Wirkung

Für den Erfolg einer Therapie ist es von Bedeutung, ob die krankheitsverursachenden Pilze nur gehemmt oder vollständig abgetötet werden.

Mit einem Diffusionstest, bei dem nur die Hemmhofdurchmesser ausgemessen und miteinander verglichen werden, läßt sich dies so nicht feststellen. Es müßten im Hemmhof liegende Pilzelemente auf frischen Nährboden verimpft werden, um zu klären, ob die Pilze noch wachsen und sich vermehren oder nicht mehr.

Nachweis pathologischer Veränderungen an *Candida albicans*

Das Ziel der antimykotischen Therapie ist es, die Pilze irreversibel so zu schädigen, daß sie ihre Rolle als Krankheitserreger nicht mehr spielen können. Die einzelnen Stufen der Schädigung lassen sich bei *Candida albicans* mikromorphologisch nachweisen.

Gut geeignet als Nährboden ist Reisagar, der im Handel erhältlich ist, aber auch selbst hergestellt werden kann. 20 g Brühereis (nicht Milcheis) werden, mit Leitungswasser bedeckt, 45 Min. gekocht und durch Mull filtriert. Das Filtrat wird mit Wasser auf 1 Liter auf-

gefüllt und nach Zugabe von 20 g Agar im Dampftopf erhitzt, bis der Agar flüssig ist, und anschließend 15 Min. bei 120°C autoklaviert.

Nach Abkühlen auf etwa 60°C wird der Reisagar in einer Schichtdicke von etwa 2 mm in Petrischalen gegossen und erstarren lassen. Die Beimpfung erfolgt mit Öse oder mykologischem Haken im Ausstrichverfahren zickzackförmig. Das Impfgut wird einer Vorkultur auf Kimmig-Agar entnommen.

Nunmehr werden zwei Deckgläser so aufgelegt, daß zwischen ihnen ein Abstand von etwa 1 cm freibleibt, um die zu prüfende Substanzlösung oder -suspension aufzutragen. Im vorliegenden Falle wurde eine wäßrige Suspension von Natamycin (Pimaricin) in einer Konzentration von 100 mg/ml mit einer Öse zwischen die Deckgläser aufgetragen. Die Suspension diffundiert in den Agar und gelangte auch unter die Deckgläser in stufenlos abnehmender Konzentration.

Die Bebrütung erfolgte bei Zimmertemperatur von etwa 20–22°C.

Die mikroskopische Beobachtung ergab schon innerhalb von 16 Stunden auffällige mikromorphologische Veränderungen, die in ihrer Ausprägung deutlich konzentrationsabhängig waren. In großer Entfernung vom Auftragungsort des Natamycins, d. h. am gegenüberliegenden Deckglasrand, entstand eine sogenannte Zebrastrreifung des Pseudomyzels (Abb. 1). Sie kommt dadurch zustande, daß eine pathologische Vakuolisierung des Zellplasmas durch das Natamycin verursacht wird.

Bei etwas höherer Konzentration, also etwa in der Mitte des vom Deckglas bedeckten Areals, verkümmerte das Pseudomyzel, und die Chlamydosporen verformten sich (Abb. 2).

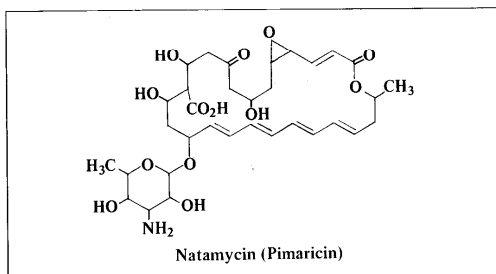


Abb. 5: Strukturformel von Natamycin (Pimaricin)

Die völlige Zerstörung des Pseudomyzels ließ sich am Deckglasrand neben dem Natamycindepot beobachten. Die Zellen lösten sich auf, die Trümmer blieben noch einige Tage sichtbar. Die Chlamydosporen erwiesen sich als etwas widerstandsfähiger, aber deutlicher Vakuolisierung folgte bald die Auflösung (Abb. 3), die im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4) sehr eindrucksvoll ist. Diese mykolytische Wirkung erinnert an die „Bakteriolyse“ durch Strahlenpilze, die Rudolf LIESKE bereits 1921 beschrieben hat. Die Bakterien wurden völlig aufgelöst und verschwanden. Aus dieser Entdeckung entwickelte sich später die Auffindung und Isolierung der von Strahlenpilzen produzierten Antibiotika, wie Streptomycin, Aureomycin, Neomycin.

Auch das 1955 entdeckte Natamycin (Pimaricin) wird von einem Strahlenpilz produziert, der *Streptomyces natalensis* genannt wurde, weil der Fundort Pietermaritzburg in Natal liegt. Auch Pimaricin deutet auf den Fundort hin.

Natamycin ist ein Tetraen. Die Strukturformel (Abb. 5) läßt erkennen, daß es sich um ein großes Molekül handelt. Derart große Moleküle haben eine geringere Diffusionsgeschwindigkeit als kleine Moleküle. Dies wirkt sich beim Diffusionstest nachteilig auf den Hemmhofdurchmesser aus. Hochwirksame Antimykotika werden infolgedessen falsch bewertet, wenn sie ein großes Molekül aufweisen und der Hemmhofdurchmesser der Bewertungsmaßstab ist. Daraus ergibt sich, daß eine routinemäßige Prüfung im Diffusionstest mit Vergleich der Hemmhofdurchmesser zum Zweck der Bewertung ungeeignet ist, um eine zuverlässige Aussage über die Eignung als Therapeutikum zu machen.

Reihenverdünnungstest

Um die minimale Konzentration eines Wirkstoffes für die totale Wachstumsunterdrückung (MHK 100%) eines Pilzes zu ermitteln, sind Reihenverdünnungsteste üblich, sowohl in flüssigem wie auf festem Medium. Daraus ergeben sich Werte, die einen Vergleich unterschiedlicher Wirkstoffe ermöglichen. Jedoch sind diese aufwendigen Untersuchungen in der Praxis nicht durchführbar.

Ähnliches gilt für die Ermittlung der minimalen Konzentration für die Abtötung eines Pilzes, zumal daraus auch keine Schlüsse in therapeutischer Hinsicht gezogen werden können.

Von Bedeutung sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen jedoch für die Konzentration der Wirkstoffe in den verschiedenen Zubereitungsformen.

Keine Resistenz der Hefen gegen Natamycin

Eine echte Resistenz von *Candida albicans* und anderer Hefepilze gegen Natamycin ist noch nicht beobachtet worden. Selbstverständlich gibt es Empfindlichkeitsunterschiede zwischen einzelnen Stämmen und Arten. Diese Unterschiede wissenschaftlich zu erforschen ist Aufgabe von Forschungszentren. In der Routine des Alltags sind die Voraussetzungen dafür nicht gegeben.

Praktisch kann man davon ausgehen, daß alle Hefen der Gattung *Candida* und verwandte Arten natamycinempfindlich sind. Im Falle therapeutischer Schwierigkeiten bedarf es also keiner Resistenzprüfung. Die Ursachen sind anderswo zu suchen, z. B. ist daran zu denken, ob überhaupt ein exakter Pilznachweis mit Identifizierung des Erregers geführt wurde und ob hinsichtlich der Durchführung der verordneten Maßnahmen eine Übereinstimmung zwischen Patient und Arzt gegeben ist. Grundkrankheiten und Ernährungsgeohnheiten spielen gerade bei Hefemykosen eine nicht zu unterschätzende Rolle. Allein schon durch kohlenhydratarme Kost wird die Vermehrung der Hefen eingeschränkt und die Wirkung eines Antimykotikums wie Natamycin erheblich gesteigert.

Hinweis für die Praxis

Primaricin (= Natamycin) ist die einzige wirksame Substanz in den Pimafucin® Arzneimitteln, die in einer breiten Palette für die topische Therapie von Dermatomykosen und Endomykosen zur Verfügung stehen und seit ihrer Einführung uneingeschränkt wirksam geblieben sind. Die nachweislich fungizide, insbesondere fungisporozide Wirkung ist von großem Vorteil bei der mykologischen Sanierung der Mundhöhle, der Atemwege und des Verdauungstraktes bei allen Kranken, die mit einer Disseminierung der Pilze aus diesen Herden mit nachfolgender sekundärer, womöglich tödlich verlaufender Mykose rechnen müssen.

In intertriginösen Bereichen kommen pimaricinempfindliche Hefen dreimal so häufig vor wie Dermatophyten. Für die gynäkologische Therapie ist es wertvoll, daß Pimaricin eine gute zusätzliche Wirkung gegen Trichomonaden hat.

Literatur

- LIESKE, Rudolf: Morphologie und Biologie der Strahlenpilze. Leipzig: Bornträger 1921
 RAAB, W. P.: Natamycin (Pimaricin). Stuttgart: Thieme Verlag 1972
 RIETH, H.: Experimentelle Pathologie der pathogenen Pilze. 73. Folge der Mykologischen Bildkartei. Mykosen 14 (1), 47 – 48 (1971)
 RIETH, H.: Hefe-Mykosen. Erreger-Diagnostik-Therapie. München-Berlin-Baltimore: Urban & Schwarzenberg 1979