

# Bifonazol – In-vitro-Wirksamkeit gegenüber *Corynebacterium minutissimum* – ein Update zur Diagnostik und Therapie des Erythrasmas

## Bifonazole – In vitro Activity Against *Corynebacterium minutissimum* – An Update of Diagnostics and Therapy of Erythrasma

### Autoren

P. Nenoff<sup>1</sup>, J. Herrmann<sup>1</sup>, C. Krüger<sup>1</sup>, N. Becker<sup>2</sup>

### Institute

<sup>1</sup> Labor für medizinische Mikrobiologie, Mölbis

<sup>2</sup> Bayer Vital GmbH, Scientific Affairs, Leverkusen

### Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1306765>  
 Online-Publikation: 16.4.2012  
 Akt Dermatol 2012; 38: 316–322  
 © Georg Thieme Verlag KG  
 Stuttgart · New York  
 ISSN 0340-2541

### Korrespondenzadresse

**Prof. Dr. med. Pietro Nenoff**  
 Labor für medizinische  
 Mikrobiologie  
 Straße des Friedens 8  
 04579 Mölbis  
 nenoff@mykologie-experten.de

### Zusammenfassung

*Corynebacterium minutissimum* wird als bakteriologische Ursache des Erythrasmas angesehen. Die Behandlung erfolgt mit topischen, manchmal systemischen Antibiotika, häufiger jedoch mit topischen Antimykotika aus der Gruppe der Imidazole. Neben Clotrimazol ist das vor allem Bifonazol, welches für diese Indikation zugelassen und wirksam ist. Es wurden 24 Stämme unterschiedlicher *Corynebacterium*-Arten, darunter *Corynebacterium (C.) minutissimum*, sowie einzelne Stämme von weiteren grampositiven Bakterien-Spezies, hinsichtlich ihrer In-vitro-Empfindlichkeit gegenüber Bifonazol untersucht. Zur Anwendung kam ein Agardilutionstest, mit des-

sen Hilfe minimale Hemmkonzentrationen (MHK) für Bifonazol bestimmt werden können.

Bifonazol zeigte gegenüber allen getesteten *Corynebacterium*-Spezies und -Stämmen eine sehr gute In-vitro-Aktivität. Die MHK-Werte lagen bei 0,05 bis 1,56 µg/ml<sup>-1</sup> (10<sup>6</sup> KbE/ml<sup>-1</sup>). Bei einer Bakteriendichte von 10<sup>8</sup> KbE/ml<sup>-1</sup> ergaben sich MHK-Werte von 0,1 bis 1,56 µg/ml<sup>-1</sup>. Es hat sich gezeigt, dass Bifonazol in vitro eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber *Corynebacterium* spp. hat. Das betrifft offensichtlich nicht nur *C. minutissimum*, sondern auch die anderen – hier getesteten – *Corynebacterium*-Arten. Das waren *C. accolens*, *C. argentoratense*, *C. jeikeium*, *C. macginleyi*, *C. propinquum* und *C. pseudotuberculosis*.

### Einleitung

Bifonazol wird bei Dermatophyten, wie z. B. der Tinea pedis, eingesetzt [1–3], aber auch bei der Behandlung von vulvovaginalen Mykosen durch *Candida*-Arten bis hin zu *Malassezia*-assoziierten Dermatosen. Jedoch auch oberflächliche bakterielle Infektionen der Haut, insbesondere die durch *Corynebacterium (C.) minutissimum* verursachte Erythrasma, lassen sich mittels Triazol-Antimykotika, u. a. mit Bifonazol, effektiv topisch behandeln [4].

Hier sollte die In-vitro-Aktivität von Bifonazol gegenüber *Corynebacterium*-Arten, nicht nur von *C. minutissimum*, sowie einer Vielzahl weiterer *Corynebacterium*-Spezies, außerdem einzelne Stämme von weiteren grampositiven Bakterien-Spezies, mit einem Agardilutionstest und Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) untersucht werden.

### Material und Methoden

#### Wirkstoff/Präparat

Die In-vitro-Empfindlichkeit des Azolantimykotikums Bifonazol (Hersteller Bayer Vital GmbH, D-51368 Leverkusen) wurde mittels Agardilutionstest untersucht. Bifonazol lag als Reinsubstanz in Form eines Pulvers vor und wurde für die Untersuchungen in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und weiter in sterilem destilliertem Wasser verdünnt. Bifonazol löst sich besser bei einem niedrigen als bei einem hohen pH-Wert.

#### Bakterienstämme

Die für die In-vitro-Empfindlichkeitstestung eingesetzten Bakterienstämme entstammten der Routinediagnostik des Labors für medizinische Mikrobiologie, Mölbis. Neben Stämmen von *C. minutissimum* sowie weiteren *Corynebacterium*-Spezies wurden auch andere grampositive Bakterien-Spezies eingesetzt. Die untersuchten Spezies und Stämme sind in **Tab. 1** aufgeführt.

**Tab. 1** Spezies und Stämme der für die In-vitro-Empfindlichkeitstestung verwendeten Bakterien.

<i>Corynebacterium accolens</i>
<i>Corynebacterium argentoratense</i>
<i>Corynebacterium jeikeium</i>
<i>Corynebacterium macginleyi</i>
<i>Corynebacterium minutissimum</i>
<i>Corynebacterium propinquum</i>
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i> (A-Streptokokken)
Koagulase-negative Staphylokokken: <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Micrococcus luteus</i>

## Nährmedien

Für die Empfindlichkeitstestung kam GAM-Agar, modified „Nisui“ (Otsuka Pharmaceutical Inc. Ltd., Frankfurt; pH 7,3) ohne antibiotische Zusätze zum Einsatz.

## Prüfung der antimykotischen Wirksamkeit von Bifonazol gegen *Corynebacterium minutissimum* und weitere grampositive Bakterien-Spezies

Die Ermittlung der antibiotischen Aktivität von Bifonazol gegen die genannten Bakterien in vitro erfolgte mittels eines Agardilutionstestes [5 – 11]. Auf diese Weise waren die Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) für die einzelnen Stämme möglich. Für die Empfindlichkeitstestung wird GAM-Agar eingesetzt. Insgesamt werden dreizehn Verdünnungsstufen Bifonazol im Nährboden hergestellt (● Tab. 2).

Dazu wird die entsprechende Menge Bifonazol zur Herstellung einer Verdünnungsreihe mit DMSO und sterilem destillierten Wasser suspendiert und in 1:1-Schritten mit *aqua destillata* weiter verdünnt. Je 2 ml des Konzentrats bzw. der Gebrauchslösung wurden mit jeweils 18 ml auf ca. 60 °C abgekühltem, noch flüssigem Nährboden vermischt. Die so erreichten Endkonzentrationen für die Reihenverdünnungsteste des Wirkstoffes reichten von 0,025 bis 100 µg ml<sup>-1</sup> Nährboden.

## Inokulum

Die Dichte der für die Testung verwendeten Bakteriensuspensionen betrug 10<sup>6</sup> und 10<sup>8</sup> KBE (Koloniebildende Einheiten) ml<sup>-1</sup>, in steriler physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Pro Be-

**Tab. 3** Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Bifonazol gegenüber verschiedenen grampositiven Bakterien-Spezies.

Bakterium-Spezies/-Stamm	MHK (µg/ml)	
	10 <sup>6</sup> KBE/ml	10 <sup>8</sup> KBE/ml
A-Streptokokken ( <i>Streptococcus pyogenes</i> )	≥ 100	≥ 100
B-Streptokokken	≥ 100	≥ 100
<i>Staphylococcus aureus</i> -Stamm 116395	≥ 100	≥ 100
Koagulase-negativer Staphylokokken-Stamm 116429	≥ 100	≥ 100
<i>Micrococcus luteus</i> -Stamm 117640	0,1	0,1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> -Stamm 116696	≥ 100	≥ 100
<i>Enterococcus</i> spp. 116613	≥ 100	≥ 100

impfungspunkt des Multipointinokulators wurden ca. 10<sup>3</sup> und 10<sup>5</sup> Keime aufgetragen.

Grundlage war der Vergleich mit dem McFarland-Standard (bio-Mérieux SA, Marcy l'Etoile, Frankreich): McFarland Standard Nr. 0,5 = 150 × 10<sup>6</sup> = 1,5 × 10<sup>8</sup>.

Diese Suspensionen werden mit einem Multipoint-Inokulator aufgetragen. Die visuelle Ablesung der Resultate erfolgt nach 24 bzw. 48 Stunden. Die Inkubation wird bei 37 °C durchgeführt. Als MHK wird die niedrigste Wirkstoffkonzentration, bei der kein Wachstum mehr auftrat, gewertet. Bei jeder MHK-Bestimmung wurden Wachstumskontrollen auf wirkstofffreiem Agar mitgeführt.

## Ergebnisse

Im Pilotversuch (● Tab. 3) zeigte sich, dass die Mehrzahl der getesteten grampositiven Bakterienarten – *Staphylococcus aureus*, Koagulase-negative Staphylokokken, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus saprophyticus* sowie A- und B-Streptokokken – mit MHK-Werten ≥ 100 µg/ml resistent gegenüber Bifonazol sind. Eine Ausnahme scheinen die apathogenen Mikrokokken – *Micrococcus luteus* – zu bilden, der MHK-Wert von 0,1 µg/ml ist sehr niedrig und spricht für eine gute In-vitro-Aktivität von Bifonazol gegen dieser Kokken-Art.

Demgegenüber waren alle *Corynebacterium*-Spezies und -Stämme in vitro sehr gut gegenüber Bifonazol empfindlich und wurden bei MHK-Werten von 0,05 bis 1,56 µg/ml (10<sup>6</sup> KBE/ml) gehemmt (● Tab. 4). Bei einer Bakteriedichte von 10<sup>8</sup> KBE/ml

Nr.	Bifonazol	D.S.T.-Agar	Konzentration (µg/ml)
I	2 ml-Gebrauchslösung	18 ml	100
II	2 ml 1 : 1-Verdünnung von I in a. d.	18 ml	50
III	2 ml 1 : 1-Verdünnung von II in a. d.	18 ml	25
IV	2 ml 1 : 1-Verdünnung von III in a. d.	18 ml	12,5
V	2 ml 1 : 1-Verdünnung von IV in a. d.	18 ml	6,25
VI	2 ml 1 : 1-Verdünnung von V in a. d.	18 ml	3,125
VII	2 ml 1 : 1-Verdünnung von VI in a. d.	18 ml	1,56
VIII	2 ml 1 : 1-Verdünnung von VII in a. d.	18 ml	0,78
IX	2 ml 1 : 1-Verdünnung von VIII in a. d.	18 ml	0,39
X	2 ml 1 : 1-Verdünnung von IX in a. d.	18 ml	0,2
XI	2 ml 1 : 1-Verdünnung von X in a. d.	18 ml	0,1
XII	2 ml 1 : 1-Verdünnung von XI in a. d.	18 ml	0,05
XIII	2 ml 1 : 1-Verdünnung von XII in a. d.	18 ml	0,025
-	-	20 ml	0 = Kontrolle

**Tab. 2** Verdünnungsreihe für Bifonazol in D.S.T.-Agar Gebrauchslösung 5 mg Bifonazol + 2 ml DMSO + 3 ml Aqua destillata (a. d.). Diese Stammkonzentration von 1000 µg ml<sup>-1</sup> wird mit a. d. in einer Verdünnungsreihe fortschreitend über 13 Verdünnungsstufen jeweils im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. Die niedrigste Konzentration dieser Verdünnungsreihe beträgt 0,025 µg ml<sup>-1</sup>.

lagen die MHK-Werte bei 0,1 bis 1,56 µg/ml. Bei einem Stamm, *C. jeikeium*, war der MHK-Wert bei 10<sup>8</sup> KBE/ml mit > 100 sehr hoch, was möglicherweise methodische Gründe hatte.

Die Isolate wurden zweimal untersucht, die Werte waren reproduzierbar, sie liegen in derselben Verdünnungsstufe oder unterschieden sich – bis auf die eine gezeigte Ausnahme – nur um eine Stufe.

Letztlich hat sich gezeigt, dass Bifonazol in vitro eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber *Corynebacterium* spp. hat. Das betrifft offensichtlich nicht nur *C. minutissimum*, sondern auch alle anderen – hier getesteten – *Corynebacterium*-Arten.

## Diskussion



### Dermatosen durch *Corynebacterium minutissimum* und andere Korynebakterien-Spezies

*Corynebacterium* spp. sind diphtheroide grampositive, sporenlöse aerobe bzw. fakultativ-anaerobe Bakterien, die u. a. für das Erythrasma und die Keratosis sulcata (pitted keratolysis), welche das dicke Stratum corneum der Plantarregion betrifft, verantwortlich zeichnen [12, 13]. Beim Erythrasma kennt man die klassische Form in der Leistenregion, darüber hinaus jedoch auch das Vorkommen in den Interdigitalräumen der Zehen. Eine weitere Korynebakterien-assoziierte Hautinfektion ist die Trichobakteriose. *C. minutissimum* wird seit seiner Erstbeschreibung 1961 darüber hinaus auch selten als Erreger von extrakutanen Infektionen nachgewiesen [14]. Das betrifft z. B. Abszesse, Katheter-assoziierte Bakteriämien, Augeninfektionen, Endokarditis, Peritonitis, kutane Granulome, Pyelonephritis bei einem Kind, Bakteriämien bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen und eine Meningitis durch *C. minutissimum*, die erfolgreich mit intravenös verabreichtem Ampicillin behandelt wurde.

### Das Erythrasma

Das Erythrasma – auch als Baerensprung'sche Krankheit bezeichnet – ist eine oberflächliche bakterielle Infektion, die vorzugsweise die intertriginöse Region der Leisten und Oberschenkelinnenseiten betrifft (● Abb. 1). Weitere Lokalisationen sind die Submammärregion, die großen Labien, die Achselhöhlen und Flanken, jedoch auch die interdigitale Haut der Zehen und Füße [15]. Das interdigitale Erythrasma wird sogar als häufigste bakterielle Infektion der Füße angesehen [16].

Klinisch imponiert ein braunrotes, makulöses, randbetontes Erythem mit Schuppung und Mazeration. Diagnoseweisend ist die typische korallenrote, nahezu brillant erscheinende Fluoreszenz unter dem Einfluss von Wood-Licht [17]. Als Erreger wird das grampositive Stäbchenbakterium *C. minutissimum* angesehen. Betroffen sind vorzugsweise auch Diabetiker [18, 19]. Weitere disponierende Faktoren sind Adipositas, Hyperhidrosis sowie Immundefekte, wie HIV/AIDS, jedoch gerade mit Blick auf die interdigitale Form auch (Leistungs-)Sport. Essenziell für die Diagnosestellung ist der Einsatz der Wood-Lampe [20], aber auch die bakteriologische Untersuchung, wobei oft eine einfache Gram-Färbung ausreichend sein kann.

### Porphyrine und Wood-Licht-Fluoreszenz beim Erythrasma

Die typische korallenrote Fluoreszenz des Erythrasmas unter der Wood-Lampe beruht auf dem Vorhandensein von Porphyrinen. Yasuma et al. [21] nahmen eine fraktionierte Porphyrin-Analyse



**Abb. 1** Erythrasma der Leiste bei einem 77-jährigen Patienten. Es imponiert eine typische livid-rote, randbetonte, zentrifugale Läsion und leichte Schuppung. Das Blancophor®-Präparat auf Pilze war negativ, Dermatophyten waren kulturell nicht nachweisbar. Es bestand lediglich eine sekundäre Besiedlung mit den apathogenen Hefepilzen *Rhodotorula* und *Cryptococcus* sowie Koagulase-negativen Staphylokokken.

beim Erythrasma vor. Sie isolierten die ursächlichen Bakterien beim Erythrasma des Zehenzwischenraums bei einem 78-jährigen Mann und bestimmten die exogene Porphyrin-Produktion der Bakterien mittels HPLC-Analyse. Die isolierten Bakterienarten wurden mittels molekularbiologischer Sequenzierung der 16S rRNA-Gen-Region als *C. aurimucosum* und *Microbacterium oxydans* bestimmt. Durch HPLC ließ sich demonstrieren, dass Coproporphyrin III (Copro III) deutlich erhöht war, wohingegen die Menge an Protoporphyrin vermindert war. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die fluoreszierende Substanz Copro III ist. Dieses Ergebnis bestätigt die Ansicht, dass die starke Copro-III-Synthese durch *C. aurimucosum* und *M. oxydans* zu einer Akkumulierung von Porphyrin im Hautgewebe führt, welches unter Wood-Licht-Exposition eine korallenrote Fluoreszenz emittiert.

### *Corynebacterium minutissimum* und andere *Corynebacterium*-Arten als Auslöser des Erythrasmas

Zwar wird immer wieder, vor allem in Lehrbüchern, die Meinung vertreten, dass *C. minutissimum* alleinige mikrobiologische Ursache der oberflächlichen Hautinfektion beim Erythrasma ist, jedoch scheint es noch andere ursächliche *Corynebacterium*-Arten sowie möglicherweise weitere Bakterien-Spezies zu geben, welche berücksichtigt werden sollten. Das betrifft neben den oben genannten Arten *C. aurimucosum* und *Microbacterium oxydans* auch die in dieser Studie isolierten Spezies *C. accolens*, *C. argentoratense*, *C. jeikeium*, *C. macginleyi*, *C. propinquum* und *C. pseudotuberculosis*.

### Erythrasma – klinische Formen

Das Erythrasma tritt in der Leistenregion, dem intertriginösen Bereich der Achselhöhlen sowie im Zehenzwischenraum in Erscheinung. Inci et al. [22] untersuchten die Prävalenz des interdigitalen Erythrasmas an den Füßen in einer südlichen Region der Türkei. Unter Patienten, bei denen klinisch die Diagnose einer Tinea pedis gestellt worden war, fand sich erstaunlicherweise in 46,7% ein interdigitales Erythrasma. Es waren vorzugsweise Männer im Altersdurchschnitt von 43,6 Jahren, das Hauptsymp-

Stamm Nr.	Labor-Nummer	Bakterium-Spezies/-Stamm	MHK (µg/ml)	
			10 <sup>6</sup> KbE/ml	10 <sup>8</sup> KbE/ml
1	122034	<i>Corynebacterium accolens</i>	0,39	0,78
2	123611	<i>Corynebacterium argentoratense</i>	0,78	1,56
3	101249	<i>Corynebacterium argentoratense</i>	0,39	0,39
4	116231	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1,56	≥ 100
5	123049	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0,39	0,78
6	123887	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0,78	0,78
7	123888	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1,56	0,78
8	123949	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0,39	0,78
9	100255	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0,39	0,78
10	100612	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0,39	0,78
11	100728	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0,39	0,78
12	100058	<i>Corynebacterium macginleyi</i>	0,39	0,78
13	Abstrich von Leiste	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	1,56	1,56
14	116220	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	0,39	0,39
15	124254	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	0,78	0,78
16	119966	<i>Corynebacterium propinquum</i>	0,39	0,39
17	122059	<i>Corynebacterium propinquum</i>	0,39	0,78
18	123158	<i>Corynebacterium propinquum</i>	0,05	0,1
19	2004	<i>Corynebacterium propinquum</i>	0,39	0,39
20	124727	<i>Corynebacterium propinquum</i>	0,2	0,39
21	124797	<i>Corynebacterium propinquum</i>	0,2	0,2
22	125219	<i>Corynebacterium propinquum</i>	0,2	0,2
23	123312	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	0,39	0,78
24	100290	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	0,39	0,39

**Tab. 4** Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Bifonazol gegenüber *Corynebacterium*-Spezies.

tom war Schuppung. Die bakteriologische Untersuchung war jedoch komplett negativ, dagegen fand sich bei 43% aller Studienteilnehmer eine positive Pilzkultur. Die Diagnosestellung Erythrasma beruhte auf dem Einsatz von Wood-Licht sowie der Gram-Färbung von Abstrichen sowie Hautschuppen. Wahrscheinlich ist das interdigitale Erythrasma häufiger als gedacht, es sollte bei klinisch vermuteter Tinea pedis als Differenzialdiagnose in Betracht gezogen werden. Wood-Licht erweist sich dabei als geeignetes diagnostisches Mittel, kombiniert mit einer Gram-Färbung des Abstriches vom Zehenzwischenraum [23]. Letzteres ist besonders bei negativem Ergebnis der Wood-Lampe zu berücksichtigen.

Ähnliche Ergebnisse gibt es aus Mexiko, wo bei 24 von 73 Patienten (32,8%) ein Erythrasma diagnostiziert wurde (korallenrote Fluoreszenz unter Wood-Licht und Nachweis von Korynebakterien in der Gram-Färbung). In dieser Untersuchung waren mehr Frauen betroffen (83,3%), das Durchschnittsalter lag ähnlich wie in der Türkei bei 43,5 Jahren. Hauptsymptome waren Schuppung und Mazeration, besonders häufig im vierten Zehenzwischenraum [24].

Auch hier ließ sich in keinem Fall *Corynebacterium* spp. kulturell isolieren. Interessant war, dass die mykologische Untersuchung bei 15 Patienten positiv war (62,5%), es fanden sich *Candida* spp. (16,6%), Dermatophyten (12,5%), und *Trichosporon* spp. (4,1%). Das gleichzeitige Vorkommen eines interdigitalen Erythrasmas und einer Tinea pedis bzw. einer interdigitalen Mykose sollte viel häufiger in Betracht gezogen werden.

Bei ausgeprägten Formen von Fußmykosen entsteht eine unangenehme Geruchsbildung. Diese sowie die Mazeration im Zehenzwischenraum beruht auf der sekundären bakteriellen Infektion des Hautareals [25]. Die ursächlichen Bakterien sind grampositive, wie *Staphylococcus aureus*, jedoch auch gramnegative, u. a. Klebsiellen und *Pseudomonas aeruginosa*, möglicherweise

spielt hierbei auch *C. minutissimum* eine Rolle. Pathogenetisch besteht eine verstärkte Bildung von bakteriellen Stoffwechselprodukten, z. B. von Fettsäuren durch die Bakterien.

### Behandlung des Erythrasmas

Bisher gibt es offensichtlich noch keinen Konsens bei der antimikrobiellen Behandlung des Erythrasmas. Neben antibakteriellen Substanzen sind es an erster Stelle lokal einsetzbare Antimykotika der Imidazol-Gruppe, die einerseits wirksam sind beim Erythrasma, andererseits auch für diese Indikation eine Zulassung haben. Das betrifft neben Clotrimazol das hier untersuchte Bifonazol, aber auch den Wirkstoff Tioconazol. Angegeben wird auch Ketoconazol als Creme zur lokalen Behandlung des Erythrasmas [15].

Als lokales Antibiotikum kommt auch Erythromycin zur Anwendung. Nur bei ausgeprägtem Verlauf und schlecht zugänglicher Lokalisation des Erythrasmas ist eine systemische Therapie zu erwägen, mit Makrolid-Antibiotika. Erfahrungen gibt es mit Erythromycin, 1 g am Tag, heute werden jedoch eher modernere Makrolide, wie Clarithromycin als Einmalgabe, eingesetzt.

Avci et al. [26] verglichen in einer doppel-blinden, Plazebo-kontrollierten Studie die Wirksamkeit einer kontinuierlichen Behandlung mit Erythromycin, die einmalige Gabe von Erythromycin und die topische Applikation von Fusidinsäure beim Erythrasma. Der Therapieerfolg wurde anhand der Reaktion auf Wood-Licht (light reflection scores) bestimmt. Fusidinsäure erwies sich als signifikant besser wirksam als die orale Gabe von Erythromycin und Clarithromycin. Beim Vergleich der beiden Makrolid-Antibiotika war Clarithromycin zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Therapie effektiver als Erythromycin, nicht jedoch am Tag 7 und 14 nach Behandlung. Die Autoren schlussfolgerten, dass die topische Gabe von Fusidinsäure in dieser Studie die besten Ergebnisse beim Erythrasma zeigte, jedoch die einmalige

Gabe von Clarithromycin eine alternative Therapieoption darstellt, einmal wegen der auch guten Wirksamkeit, zum anderen jedoch auch wegen der besseren Compliance der Patienten.

### Bifonazol

Bifonazol (1-((4-Biphenyl)-Phenylmethyl)-1H-Imidazol) hat als Imidazol-Antimykotikum eine sehr gute und vor allem breite In-vitro- und In-vivo-Aktivität gegenüber nahezu allen infrage kommenden pathogenen Pilzen, die Erreger von Haut- und Schleimhautmykosen sind [27]. Bifonazol hemmt die Ergosterol-Biosynthese an zwei verschiedenen Teilschritten der Synthesekette, was im Gegensatz zu anderen Azol-Antimykotika steht, die nur einen einfachen Wirkansatz haben [28]. Diese Hemmung des Aufbaus und der Funktion der Zytoplasmamembran der Pilze bedingt die fungistatische, bei höheren Wirkstoffkonzentrationen auch fungizide Wirkung von Bifonazol gegenüber humanpathogenen Pilzen.

Die Bifonazol-Applikation führt zusätzlich zu einer im Vergleich zu Clotrimazol insgesamt verminderten Sterin-Syntheserate, die auf einer direkten Hemmung der mikrosomalen HMG-CoA-Reduktase beruht. Die bei Bifonazol zusätzlich zur fungistatischen Wirkung beobachtete Fungizidie wird einer Sequenzialwirkung durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase und des Cytochroms P<sub>450</sub> zugeschrieben [29].

Bifonazol hat bei Konzentrationen von 5 µg/ml und einer Einwirkungszeit von 6 Stunden einen fungiziden Effekt auf Dermatophyten. Gegenüber Hefen, z.B. *Candida*-Arten, wirkt Bifonazol in Konzentrationen von 20 µg/ml fungizid.

Bifonazol penetriert gut in die von der Pilz- oder Bakterien-Infektion betroffenen epidermalen Schichten. Sechs Stunden nach lokaler Applikation lassen sich Bifonazol-Konzentrationen in der Epidermis messen, die den MHK-Werten der Erreger von Dermatomykosen entsprechen oder diese sogar um ein Vielfaches überschreiten: 1000 µg/cm<sup>3</sup> im Stratum corneum der Epidermis bis 5 µg/cm<sup>3</sup> im Stratum papillare des Koriums. Ein Vorteil von Bifonazol im Vergleich zu z.B. Ciclopirox ist die etwas längere Verweildauer in der Epidermis [30].

### In-vitro-Aktivität von Bifonazol

Bifonazol hat eine gute In-vitro-Aktivität gegenüber diversen Hefepilzen, u.a. *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Malassezia furfur* (früher *Pityrosporum ovale*), und Bakterien, wie *Propionibacterium acnes* und *Staphylococcus epidermidis* [31,32]. MHK-Werte gegenüber *Malassezia furfur* betragen im Durchschnitt 8,1 µg/ml [33]. Damit war Bifonazol zwar in vitro weniger wirksam als die gegen diese lipophile Hefe aktivste „Standardsubstanz“ Ketoconazol, lag aber deutlich vor Miconazol, Clotrimazol, Flutrimazol und Sertaconazol. In einer eigenen Untersuchung erwies sich Bifonazol ebenfalls als effektiv gegenüber von Patienten isolierten *Malassezia*-Stämmen, der geometrische Mittelwert der MHK betrug 7,9 µg/ml für Bifonazol, lag also im gleichen Bereich, wie in der oben erwähnten Studie [9].

Yamaguchi und Uchida [34] verfolgten den Verlauf der In-vitro-Empfindlichkeit von insgesamt 188 Dermatophytenisolaten über einen Zeitraum von 10 Jahren. Für Bifonazol fand sich kein einziges resistentes Isolat von *Trichophyton rubrum* oder *Trichophyton mentagrophytes* (Agardilution, alle MHK <5 µg ml<sup>-1</sup>). Plempel et al. [35] haben bereits vor Jahren gezeigt, dass Bifonazol in Konzentrationen ≤5 µg/ml fungizid auf Dermatophyten wirkt. Für den problematischen Hefepilz *Candida glabrata* fand sich sogar ein noch niedrigerer MHK-Wert von ≤0,25 µg/ml.

Nicht-Dermatophyten-Schimmelpilze (nondermatophyte molds, NDM), die bei Onychomykosen isoliert werden können, zeigen ebenfalls eine (akzeptable) In-vitro-Empfindlichkeit gegenüber Bifonazol. So wies Bifonazol variable minimale Hemmkonzentrationen gegenüber *Aspergillus*- und *Scopulariopsis*-Arten auf [36]. Aktuell wurde demonstriert, dass phenolische, aus *Quercus-ilex*-Blättern (Steineiche) isolierte Verbindungen, die zur Klasse der Flavonoide, Proanthocyanidine und Phenolsäure gehören, in Kombination mit Bifonazol oder Ketoconazol eine synergistische In-vitro-Wirksamkeit gegenüber humanpathogenen Bakterien und Pilzen aufweisen [37].

El Hage et al. [38] untersuchten die Synthese sowie die antibakterielle und antimykotische Aktivität von neuen Derivaten von Bifonazol. Verschiedene chlorierte Benzhydrylimidazole und -triazole wurden synthetisiert und in vitro gegen diverse Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) und Pilze (*Trichophyton rubrum* und *Aspergillus niger*) getestet. Ein Teil der Substanzen hemmte den Dermatophyten *Trichophyton rubrum* mit MHK-Werten von 0,125 bis 32 µg/ml ähnlich gut bzw. auch besser als die Standardsubstanzen Bifonazol und Clotrimazol.

### Bifonazol – erfolgreicher Einsatz beim Erythrasma

Das Imidazol-Antimykotikum Bifonazol wird primär zur Behandlung diverser Dermatomykosen durch Dermatophyten, Hefen (*Candida*-Arten und *Malassezia* spp.) und Schimmelpilze eingesetzt. Das sind z.B. Tinea pedum, Tinea manuum, Tinea corporis, Tinea inguinalis, Pityriasis versicolor und oberflächliche Candidosen der Haut. Schon länger bekannt ist der erfolgreiche Einsatz beim Erythrasma, einer sehr häufigen oberflächlichen Hautinfektion der Intertrigines. Die klinische Wirksamkeit beruht auf der in vitro und in vivo nachweisbaren Aktivität gegenüber den ursächlichen grampositiven Korynebakterien-Arten. Darüber hinaus kann mit Bifonazol das seborrhoische Ekzem erfolgreich behandelt werden [39]. Die Wirksamkeit beim seborrhoischen Ekzem – einer *Malassezia*-assoziierten Dermatoze – beruht dabei, genau wie bei den systemisch einsetzbaren Präparaten Itraconazol und Ketoconazol, nicht nur auf der antimykotischen Aktivität, sondern auch auf der antientzündlichen Wirksamkeit von Bifonazol [40].

Zawar [41] beschrieb aktuell in Indien einen 38-jährigen übergewichtigen Mann mit Trichomykosis axillaris, einer häufig vorkommenden tropischen Dermatoze, die die Haarschäfte im Axillarbereich befällt. Auffälliges Symptom sind Knötchen, die sich entlang der Haarschäfte erstrecken. Ätiologisch wird eine Infektion durch *C. tenuis* oder auch andere *Corynebacterium*-Arten für diese kosmetisch störende Haarerkrankung verantwortlich gemacht. Heute geht man davon aus, dass verkapselte Korynebakterien, die sich als Biofilm formatiert haben, zu einer verstärkten Adhärenz an den Haaren und der Haut führen, wodurch letztlich auch die immunologische Abwehr des Wirts abgewehrt wird [42–44]. Bei diesem Patienten war die topische Behandlung mit 3%iger Erythromycin-haltiger Creme sowie Clotrimazol als Puder in Kombination mit einer Rasur des betroffenen Areals erfolgreich.

### Fotodynamische Therapie beim Erythrasma

Porphyrine, die beim Erythrasma von *C. minutissimum* gebildet werden, sind fotosensibilisierende Substanzen, die wahrscheinlich durch rotes Licht aktiviert werden können (fotodynamische Reaktion). Deshalb wurde eine Studie zur Wirksamkeit der fotodynamischen Therapie (PDT) beim Erythrasma, ohne Applikation

eines Fotosensibilisators, durchgeführt [45]. Von 13 Patienten mit Erythrasma waren drei durch die PDT komplett geheilt, bei den anderen kam es zu einer deutlichen Reduktion der Läsionen.

## Fazit

Bifonazol hat sich in dieser Studie zur Empfindlichkeitstestung als eine *in vitro* sehr aktive Substanz gegenüber *C. minutissimum*, dem Erreger des Erythrasmas, aber auch gegen eine Vielzahl weiterer *Corynebacterium*-Spezies erwiesen. Damit wird in dieser aktuellen Untersuchung die klinisch bekannte Wirksamkeit dieses Imidazol-Derivates bei dieser häufig vorkommenden oberflächlichen bakteriellen Infektion der Haut der Intertrigines an den Leisten und den Zehenzwischenräumen herausgestellt. Das Krankheitsbild des Erythrasmas, vor allem in den Interdigitalräumen der Zehen, kommt wahrscheinlich deutlich häufiger vor, als bislang diagnostisch berücksichtigt. Zu denken ist zudem immer auch an das gleichzeitige Vorliegen einer Tinea pedis durch Dermatophyten oder einer interdigitalen Mykose durch *Candida*-Arten. Die Diagnosestellung des Erythrasmas beruht, wie oben dargestellt, auf dem klinischen Bild sowie ggf. dem Einsatz von Wood-Licht, zusätzlich sollte eine mögliche Pilzinfektion mittels mykologischer Labordiagnostik verifiziert werden. Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, für die Therapie sowohl des Erythrasmas als auch der interdigitalen Mykose ein Antimykotikum zu wählen, welches wie z. B. Bifonazol neben der reinen antimykotischen Wirkung auch die erforderliche antibakterielle Aktivität aufweist.

## Interessenkonflikt



Die Studie wurde unterstützt von der Firma Bayer Vital GmbH.

## Abstract

### Bifonazole – In vitro Activity Against *Corynebacterium minutissimum* – An Update of Diagnostics and Therapy of Erythrasma



The gram-positive bacteria *Corynebacterium minutissimum* are known as causative agent of the erythrasma. The treatment is based on the application of topical antibiotics, sometimes oral antibiotics have to be used. However, more frequently, topical antifungal agents of the imidazole group are used for erythrasma. This is, after clotrimazole, first of all bifonazole, which is approved for treatment of this superficial bacterial infection of the skin, and has been shown to be efficient in this dermatosis. Altogether, 24 strains of different species of the genus *Corynebacterium*, among them *Corynebacterium* (*C.*) *minutissimum*, and single strains of further species of other gram-positive bacteria, were investigated for their *in vitro* susceptibility against bifonazole. An agar dilution test was used for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of bifonazole. Bifonazole showed a very good *in vitro* activity against all tested species and strains of *Corynebacterium*. MIC values were in a range from 0.05 until 1.56 µg ml<sup>-1</sup> (10<sup>6</sup> cfu [colony forming units] ml<sup>-1</sup>). At a higher density of bacteria (10<sup>8</sup> cfu ml<sup>-1</sup>) MIC values at a range from 0.1 until 1.56 µg ml<sup>-1</sup> were found. In conclusion, it could be demonstrated that bifonazole exhibits a very good *in vitro* activity against *Corynebacterium* spp.

Obviously, this concerns not only the species *C. minutissimum*, but also the other tested species of *Corynebacterium*, which were *C. accolens*, *C. argentoratense*, *C. jeikeium*, *C. macginleyi*, *C. propinquum*, and *C. pseudotuberculosis*.

## Literatur

- 1 Earl D, Allenby L, Richards H et al. Bifonazole 1% gel in the treatment of superficial dermatophytoses and erythrasma of the feet and groin. *Pharmatherapeutica* 1986; 4: 532–535
- 2 Wagner W, Reckers-Czaschka R. Oxiconazol bei Dermatomykosen – ein doppelblinder, randomisierter Therapievergleich mit Bifonazol. *Mykosen* 1987; 30: 484–492
- 3 Watanabe S, Takahashi H, Nishikawa T et al. A comparative clinical study between 2 weeks of luliconazole 1% cream treatment and 4 weeks of bifonazole 1% cream treatment for tinea pedis. *Mycoses* 2006; 49: 236–241
- 4 Massone L, Pestarino A, Borghi S et al. Treatment of erythrasma with 1% bifonazole cream. *Clin Ter* 1987; 123: 105–109
- 5 Nenoff P, Hausteil UF. Der Effekt antiseborrhoischer Substanzen gegenüber *Pityrosporum ovale in vitro*. *Hautarzt* 1994; 45: 464–467
- 6 Nenoff P, Hausteil U-F. *In vitro* susceptibility testing of *Pityrosporum ovale* against antifungal, antiseborrhoic and antipsoriatic agents. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 1994; 3: 331–333
- 7 Nenoff P, Hausteil U-F, Brandt W. Antifungal activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against pathogenic fungi *in vitro*. *Skin Pharmacol* 1996; 9: 388–394
- 8 Nenoff P. *In vitro*-Empfindlichkeitstestung von *Malassezia furfur*. *Zeitschr H+G* 1997; 72: 104–109
- 9 Nenoff P, Hausteil UF. *In vitro* susceptibility testing of *Malassezia furfur* against rilopirox. *Skin Pharmacology* 1997; 10: 275–280
- 10 Nenoff P, Hausteil UF. *In vitro* activity of phytosphingosines against *Malassezia furfur* and *Candida albicans*. *Acta Dermato-Venerol* 2002; 82: 170–173
- 11 Nenoff P, Hausteil UF, Hittel N. Activity of nadifloxacin (OPC-7251), and seven other antimicrobial agents against aerobic and anaerobic bacteria isolated from bacterial skin infections. *Chemotherapy* 2004; 50: 196–201
- 12 Blaise G, Nikkels AF, Hermanns-Lê T et al. *Corynebacterium*-associated skin infections. *Int J Dermatol* 2008; 47: 884–890
- 13 Rho NK, Kim BJ. A corynebacterial triad: Prevalence of erythrasma and trichomycosis axillaris in soldiers with pitted keratolysis. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58: 57–58
- 14 Dalal A, Likhil R. *Corynebacterium minutissimum* bacteremia and meningitis: a case report and review of literature. *J Infect* 2008; 56: 77–79
- 15 Altmeyer P. Erythrasma. In: *Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie, Umweltmedizin*. Berlin Heidelberg: Springer; Online-Ausgabe 2010
- 16 Hodson SB, Henslee TM, Taichibana DK et al. Interdigital erythrasma. Part I: A review of the literature. *J Am Pod Med Assoc* 1988; 78: 551–558
- 17 Miller SD, David-Bajar K. Images in clinical medicine. A brilliant case of erythrasma. *N Engl J Med* 2004; 351: 1666
- 18 Mahajan S, Koranne RV, Sharma SK. Cutaneous manifestation of diabetes mellitus. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2003; 69: 105–108
- 19 Ahmed I, Goldstein B. Diabetes mellitus. *Clin Dermatol* 2006; 24: 237–246
- 20 Ruocco E, Baroni A, Donnarumma G et al. Diagnostic procedures in dermatology. *Clin Dermatol* 2011; 29: 548–556
- 21 Yasuma A, Ochiai T, Azuma M et al. Exogenous coproporphyrin III production by *Corynebacterium aurimucosum* and *Microbacterium oxydans* in erythrasma lesions. *J Med Microbiol* 2011; 60: 1038–1042
- 22 Inci M, Serarslan G, Ozer B et al. The prevalence of interdigital erythrasma in southern region of Turkey. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 07. 10. 2011: DOI: 10.1111/j.1468-3083.2011.04293.x. (Epub ahead of print)
- 23 Maleki M, Fata A. Evaluation of wood's light and direct smear for diagnosis of pityriasis versicolor and erythrasma. *Saudi Med J* 2005; 26: 1483–1484
- 24 Morales-Trujillo ML, Arenas R, Arroyo S. Interdigital erythrasma: clinical, epidemiologic, and microbiologic findings. *Actas Dermosifiliogr* 2008; 99: 469–473

- 25 Nenoff P, Krüger C. Dermatophyten-Infektionen der Haut, Haare und Nägel – klinische Aspekte – ein Update, Teil 1. Akt Dermatol 2012; im Druck
- 26 Avci O, Tanyildizi T, Kusku E. A comparison between the effectiveness of erythromycin, single-dose clarithromycin and topical fusidic acid in the treatment of erythrasma. J Dermatolog Treat 18. 09. 2011: (Epub ahead of print)
- 27 Macura AB. *In vitro* susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a comparison of two methods. Int J Dermatol 1993; 32: 533–536
- 28 Berg D, Plempel M. Bifonazole, a biochemist's view. Dermatologica 1984; 169 (Suppl. 01): 3–9
- 29 Berg D, Regel E, Harenberg HE et al. Bifonazole and clotrimazole. Arzneimittel-Forsch/Drug Res 1984; 34: 139–146
- 30 Hänel H, Abrams B, Dittmar W et al. A comparison of bifonazole and ciclopiroxolamine: *In vitro*, animal, and clinical studies. Mycoses 1988; 31: 632–640
- 31 Barug D, Bastiaanse HB. An evaluation of the antifungal effect of bifonazole on *Torulopsis glabrata* and *Candida albicans* under various *in vitro* test conditions. Arzneimittelforschung 1983; 33: 524–528
- 32 Camoutsis C, Geronikaki A, Ciric A et al. Sulfonamide-1,2,4-thiadiazole derivatives as antifungal and antibacterial agents: synthesis, biological evaluation, lipophilicity, and conformational studies. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2010; 58: 160–167
- 33 Gerven FV, Odds FC. The anti-*Malassezia furfur* activity *in vitro* and in experimental dermatitis of six imidazole antifungal agents: bifonazole, clotrimazole, flutrimazole, ketoconazole, miconazole and sertaconazole. Mycoses 1995; 38: 389–393
- 34 Yamaguchi H, Uchida K. Susceptibility of clinical isolated dermatophytes to bifonazole since its launch in Japan 10 years ago. Abstract, 13th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Salsomaggiore Terme, Parma, Italy, June 8–13, 1997
- 35 Plempel M, Regel E, Büchel KH. Antimycotic efficacy of bifonazole *in vitro* and *in vivo*. Arzneimittel-Forsch/Drug Res 1983; 33: 517–524
- 36 Trovato L, Rapisarda MF, Greco AM et al. *In vitro* susceptibility of non-dermatophyte molds isolated from onychomycosis to antifungal drugs. J Chemother 2009; 21: 403–407
- 37 Karioti A, Sokovic M, Ciric A et al. Antimicrobial properties of *Quercus ilex* L. proanthocyanidin dimers and simple phenolics: evaluation of their synergistic activity with conventional antimicrobials and prediction of their pharmacokinetic profile. J Agric Food Chem 2011; 59: 6412–6422
- 38 El Hage S, Lajoie B, Feuillolay C et al. Synthesis, antibacterial and antifungal activities of bifonazole derivatives. Arch Pharm (Weinheim) 2011; 344: 402–410
- 39 Gupta AK, Nicol K, Batra R. Role of antifungal agents in the treatment of seborrheic dermatitis. Am J Clin Dermatol 2004; 5: 417–422
- 40 Tronnier H, Herling M, Wiebusch M et al. Untersuchungen zur antiphlogistischen Wirkung von Bifonazol. Akt Dermatol 2005; 31: 21–26
- 41 Zawar V. Photoletter to the editor: Trichomycosis (trichobacteriosis) axillaris. J Dermatol Case Rep 2011; 5: 36–37
- 42 Coyle MB, Lipsky BA. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. Clin Microbiol Rev 1990; 3: 227–246
- 43 Orfanos CE, Schloesser E, Mahrle G. Hair destroying growth of *Corynebacterium tenuis* in the so-called trichomycosis axillaris. New findings from scanning electron microscopy. Arch Dermatol 1971; 103: 632–639
- 44 Shelley WB, Miller MA. Electron microscopy, histochemistry, and microbiology of bacterial adhesion in trichomycosis axillaris. J Am Acad Dermatol 1984; 10: 1005–1014
- 45 Darras-Vercambre S, Carpentier O, Vincent P et al. Photodynamic action of red light for treatment of erythrasma: preliminary results. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2006; 22: 153–156