

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***Candida albicans, C. dubliniensis, C. krusei és C. tropicalis* fajok paradox
növekedése nagy koncentrációjú caspofungin jelenlétében**

Írta:
Dr. Varga István



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen
2011

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***Candida albicans, C. dubliniensis, C. krusei és C. tropicalis* fajok paradox
növekedése nagy koncentrációjú caspofungin jelenlétében**

Írta:
Dr. Varga István

Témavezető:
Dr. Majoros László Ph.D.



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen
2011

Impresszum

***Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* és *C. tropicalis* fajok paradox növekedése
nagy koncentrációjú caspofungin jelenlétében**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Varga István

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Majoros László Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora

Dr. Szentmiklósi József, kandidátus

A doktori szigorlat időpontja: 2011. június 21. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kovács Péter, kandidátus

Dr. Urbán Edit, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora

Prof. Dr. Kovács Péter, kandidátus

Dr. Szentmiklósi József, kandidátus

Dr. Urbán Edit, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2011. június 21. 13 óra

BEVEZETÉS

A Candida fajok által okozott fertőzések epidemiológiája

Az utóbbi időben számos antifungális szert vezettek be a klinikai gyakorlatba, így például az újabb generációs azolokat és az echinocandinokat. Ezekkel a szerekkel jó klinikai eredmények érhetők el olyan invazív gombás fertőzések esetében is, melyekben a konvencionális antimikotikus terápia már hatástalannak bizonyult. Az invazív mikózisok gyakori kísérői a súlyos általános betegségeknek, és gyakran vezetnek halálos szövődményekhez is. Kialakulásukban a legfontosabb predisponáló tényezők az immunszuppresszív terápia, a diabetes mellitus, a malignus folyamatok, a túl magas vagy túl alacsony életkor, a sebészeti beavatkozások és az AIDS.

Az újabb antifungális szerek kifejlesztésére azért volt szükség, mert a *Candida* fajok epidemiológiájában jelentős változások történtek. Bár a legfontosabb patogén, továbbra is a *C. albicans*, egyéb fajok, mint a *C. glabrata*, a *C. parapsilosis*, a *C. tropicalis* és a *C. krusei* jelentősége is folyamatosan növekszik. Fontos továbbá, hogy a nem *C. albicans* fertőzések gyakran társulnak hematológiai malignus folyamatokhoz, illetve az életkor függvényében is változik bizonyos fajok megjelenése. Ezek alapján idősebb betegeknél fokozatosan csökken a *C. parapsilosis* incidenciája, viszont a *C. glabrata* által okozott invazív mikózisok aránya növekszik.

Az elmúlt időszakban számos vizsgálat igazolta a nem *C. albicans* fajok jelenlétét és patogén szerepét a szájüregben. Ezek közül az egyik legtöbbet vizsgált orális patogén a *C. albicans*-hoz fenotípusosan hasonló *C. dubliniensis*, melyet HIV fertőzött betegek orális léziójából sikerült először izolálni. *C. dubliniensis* fertőzésnél egyes szerzők súlyos extraorális kórképek kialakulását (candidemia, meningitisz) is leírták.

Az irodalmi adatok szerint tehát erőteljesen növekedett a nem *C. albicans* fajok által okozott megbetegedések száma, mind a szuperficiális mind pedig a szisztémás gombás fertőzések esetében, és ilyenkor a betegek túlélési esélyei is rosszabbnak bizonyultak. A magas mortalitás csökkentése egyrészt a mikózisok minél korábbi diagnózisa, másrészt az alkalmazott antifungális szerek hatásának a pontosabb megismerése által lehetséges.

Az antifungális érzékenység meghatározása sarjadzó gombák esetében

Az antifungális érzékenység meghatározásánál a referencia eljárás a standard dilúciós (hígítási) módszer. A standard dilúciós módszert két nagyobb csoportra lehet osztani. Az egyik a *standard makrodilúciós módszer*, melynek lényege hogy 10 mL-es végtérfogattal dolgozunk (táptalaj+antifungális szer+gomba) a MIC érték meghatározása során.

A MIC (minimális gátló koncentráció) definíció szerint az adott antifungális szer azon legkisebb koncentrációja, amely már gátolja a mikroorganizmusok szemmel látható növekedését a gyógyszert nem tartalmazó kontrollhoz képest.

A *mikrodilúciós módszer* protokollját 2002-ben módosította a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), és az M27-A2 jelzésű dokumentumában foglalta össze a változásokat. Az utóbbi tíz évben kifejlesztett echinocandinok esetében is ezt a módszert használjuk. Az így felállított standardoknak köszönhetően a módszer jól reprodukálhatóvá vált.

A mikrodilúciós módszer esetén az RPMI-1640 nevű folyékony tápközeget alkalmazzuk, amelynek pontos összetételét az M27-A2 tartalmazza. A kezdő csíraszám általában 10^3 CFU/mL, és a vizsgálat kivitelezésénél a 96 üregű ELISA lemezt használjuk, valamint 24-48 órás inkubációs idő elteltével olvassuk le a MIC értéket.

A standard mikrodilúciós módszernél alkalmazott tápközeget egyik lehetséges alternatívája az antibiotikum médium 3 (AM3) lehet, amely egyrészt megkönnyítheti a MIC érték leolvasását, másrészt, az antifungális szer fungicid aktivitását is befolyásolhatja.

A MIC értékének meghatározása során észlelhetjük az úgynevezett „trailing” hatást, amely redukált, de folyamatos növekedést jelent a MIC érték feletti koncentrációkon.

A minimális fungicid koncentráció meghatározása

A minimális fungicid koncentráció (MFC) definíció szerint az antifungális szer azon legkisebb koncentrációja, amely a gomba 99,9%-át elpusztítja 24 óra alatt a kiindulási inokulumhoz képest.

Az MFC a gyógyszer *in vitro* ölési képességét jellemzi. Sajnos a módszer nincs standardizálva sem a különböző gyógyszerekre, sem a különböző *Candida* fajokra. Ráadásul, a korábbi tanulmányokban legfeljebb 90-99 %-os ölési rátát mérhettek csupán a szerzők, amikor 10-100 μ L térfogatot oltottak ki Sabouraud-agarra a táplemez azon üregeiből, amelyben növekedést nem tapasztaltak. Ennek oka abban keresendő, hogy a MFC érték meghatározását általában a MIC érték meghatározása előzi meg, és a standard módszerben (NCCLS M27-A2) a kiindulási inokulum sejtszáma csupán $0,5 \times 10^3$ vagy $2,5 \times 10^3$ CFU/mL

lehet. Ebben az esetben azonban még az egész volumen felhasználása mellett sem teljesíthető az MFC diagnosztikus kritériuma (99,9%-os redukció).

A probléma kiküszöbölésére Canton és munkatársai módosításokat javasoltak az MFC meghatározásánál AMB esetében. A diagnosztikus kritérium teljesítése miatt nagyobb kezdő csíraszámot (10^4 CFU/mL), és nagyobb mintavételi térfogatot (200 μ L) használtak. Az antifungális „carryover” elkerülése végett a Sabouraud agarra történő leoltás után a foltot hagyták megszáradni, majd óvatosan kaccsal „kihúzták” a telepeket a megszáradt foltról. Ezen vizsgálat alapján úgy találták, hogy a megnövelt kezdeti inokulum koncentráció nem növelte szignifikáns mértékben a MIC értékeket, tehát ezekkel a módosításokkal lehetővé vált a fungicid hatás definíció szerinti meghatározása.

Az idő-ölés görbék meghatározása

Egy adott szer fungicid hatásának jellemzésére az MFC értékének meghatározása mellett az úgynevezett idő-ölés („time-kill”) görbék is alkalmasak. Ennek a módszernek a segítségével, jóval dinamikusabban írható le az antifungális szer és a kórokozó között kialakuló kölcsönhatás, és a klinikum számára is hasznosabb információkat nyújthat. A görbéket általában arra használjuk, hogy megállapítsuk egy adott szer fungicid vagy fungisztikus hatását különböző kórokozók ellen, de vizsgálható még az antagonista és szinergista is hatás két vagy több antifungális szer között.

A vizsgálómódszer standardizálása Klepser tett kísérletet, felhasználva az M27-A2 dokumentum által leírt kritériumokat (10^3 CFU/mL, RPMI-1640, 48 órás inkubációs idő).

Hogy a 99,9%-os fungicid hatás detektálása lehetővé váljon, a kiindulási inokulum koncentrációját megnövelte (10^5 CFU/mL). A mintavételi hibák és az antifungális „carryover” kiküszöbölése érdekében a mintavételi volument 4x 30 μ L-ben állapította meg.

Az így „standardizált” idő-ölés módszer jó reprodukálhatósággal rendelkezik (90-93%).

Bár a módszer az RPMI-1640 tápközeg használatát javasolja a vizsgálatokhoz, abban több szerző is egyetért, hogy a fungicid hatás nagymértékben függ a választott médium típusától is, így az echinocandinoknál is megfigyelhető ez az eltérés különböző tápközegek esetén (RPMI-1640/AM3).

Rezisztencia és a paradox növekedés echinocandinok esetén

A β -1,3-D-glükán szintetáz enzim egy több alegységből álló enzim komplex, amelynek feladata a gomba sejtfal integritásának fenntartása. Az echinocandinok a glükán szintetáz Fks1 alegységen fejtik ki hatásukat, és ennek az enzimnek a mutációja különböző mértékű

rezisztenciát eredményezhet. *C. parapsilosis* és a *C. guilliermondii* esetén a MIC érték akár a 100-szorosa is lehet a *C. albicans* fajoknál tapasztalt alacsonyabb MIC értékeknek. Magas MIC (> 2 mg/L) értékkel rendelkező *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. tropicalis* klinikai izolátumokat és terápiás sikertelenséget is tapasztalt több szerző. Egyes esetekben a glükán szintetáz enzim Fks1 alegységének az 1. és a 2. ún. „forró területein” („hot-spot” régiók) mutattak ki aminosav változást.

A glükán szintetáz működésének gátlása adaptív stressz válaszként kompenzatórikus kitinszint, emelkedést is eredményezhet. Ez a folyamat lehet a felelős, a *C. albicans*, nagy koncentrációjú caspofungin jelenlétében történő, úgynevezett paradox növekedéséért.

A paradox növekedés (paradoxical growth=PG) definíció szerint azt jelenti, hogy a MIC érték felett még legalább két üregben növekedésgátlás van, de a magasabb koncentrációkon szabad szemmel láthatóan is megjelenik a növekedés a táplemez üregeiben. A paradox hatás kialakulása tehát az alkalmazott koncentráció függvényében négyfázisú folyamat: a MIC alatti értékeken növekedés, a MIC értéken gátlás, magasabb koncentráción a gátlás megszűnése (újbóli növekedés), majd végleges gátlás látható. Azaz, minél nagyobb a gyógyszernek a koncentrációja, annál kisebb lehet a gyógyszer hatékonysága. Ezek az *in vitro* eredmények megkérdőjelezték, hogy magasabb gyógyszerkoncentrációk esetében, a caspofungin (és a többi echinocandin) hatékonysága is növekszik.

Munkám kezdetén a nemzetközi szakirodalomban még viszonylag kevés adat állt rendelkezésre a caspofungin jelenlétében kialakuló paradox növekedés vizsgálatáról. Ezért kutatásaim során a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségügyi Centrum Orvosi Mikrobiológiai Intézetében izolált sarjadzó gombák *in vitro* érzékenységi vizsgálatát végeztem el, melyek során a paradox növekedés felismerésének a lehetőségeit is vizsgáltam. Végezetül választ kerestem arra a kérdésre is, hogy a kapott *in vitro* eredményeknek milyen klinikai vonatkozásai lehetnek.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A minimális gátló koncentráció értékek meghatározásával RPMI-1640 és antibiotikum médium 3 táptalajban szeretnénk volna arra a kérdésre választ találni, hogy a *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* és *C. tropicalis* fajok milyen gyakorisággal mutatnak paradox növekedést magas caspofungin koncentráció alkalmazása esetén.
2. A paradox növekedés pontosabb előfordulási gyakoriságát próbáltuk meghatározni RPMI-1640 és antibiotikum médium 3 táptalajban az idő-ölés görbék és a minimális fungicid koncentráció értékek összehasonlító vizsgálatával.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A sarjadzó gombák eredete

Vizsgálataink során a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Orvosi Mikrobiológiai Intézetében izolált *Candida* törzsek közül választottunk ki 45 izolátumot (15 db *C. albicans*, 15 db *C. krusei*, 15 db *C. tropicalis*). Minden faj esetén az American Type Culture Collection (ATCC®) tesztörzseit használtuk referenciaként (*C. albicans* ATCC 14053, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750). Hat db *C. dubliniensis* izolátumot korábbi munkájából Somogyvári Ferenc bocsátott a rendelkezésünkre, és a *C. dubliniensis* esetében referenciaként a CD36 jelzésű törzset használtuk. A törzsek részben vérből kerültek izolálásra (*C. albicans* 8 db, *C. krusei* 4 db, *C. tropicalis* 5 db), illetve sebváladékból, testüregekből, nyálkahártyákról és szájüregből történt a mintavételezésük.

A sarjadzó gombák azonosítása

A törzsek azonosításának első lépése a csíratömlő képzés kimutatásán alapult, amely esetében a Sabouraud-agaron kinőtt tenyészeteket főtális borjúszerűumban inkubáltuk 2 órán át. A teszt pozitív volt a *C. albicans*, míg negatív a *C. tropicalis*, és *C. krusei* fajok esetén.

A törzsek előzetes elkülönítésére, illetve a tenyészetek tisztaságának ellenőrzésére CHROMagar Candida (Becton Dickinson) táptalajt használtunk. A további azonosításokban szerepelt még az API ID32 panel (BioMérieux), amely eredményeit 48 órás inkubáció után olvastuk le. A 6 db *C. dubliniensis* izolátum azonosítása molekuláris biológiai módszerek alapján már korábban megtörtént.

A minimális gátló koncentráció meghatározása

A MIC érték meghatározását a NCCLS M27-A2 dokumentum ajánlásának megfelelően végeztük el. A korábban említettek szerint a standard 10^3 CFU/mL mellett emelt csíraszámokkal (10^5 CFU/mL) is meghatároztuk a MIC értéket mind RPMI-1640, mind pedig AM3 tápközegben.

A CAS (Merck Research Laboratories) szubsztanciát steril desztillált vízben (standard NCCLS módszernek megfelelően) oldottuk fel. A táplemez üregeiben a CAS koncentráció a *C. tropicalis* esetén 0,024-12,5 mg/L, a többi faj esetében 0,015-8 mg/L volt. Az MFC meghatározásához is ugyanezen CAS táplemezeket használtuk, melyeket -20 °C-on tároltuk. A gombaszuszpenziók elkészítése során az előírásnak megfelelő 0,5 McFarland sűrűségű

oldatot készítettünk denzitométer segítségével (0,85%-os fiziológiás sóoldat felhasználásával). Minden táplemezen volt sarjadzó gombát nem tartalmazó táptalaj kontroll (negatív kontroll), illetve egy gyógyszert nem tartalmazó gomba kontrol (növekedési kontroll). Minden vizsgálatot legalább kétszer végeztünk el.

A minimális fungicid koncentráció meghatározása

A CAS iránti MFC meghatározása az összes izolátum esetében a mikrodilúciós lemezek 48 órán keresztül 35 °C-on történő inkubációja után történt meg. Az inokulumok kezdő csíraszama 10^5 CFU/mL volt mind RPMI-1640, mind, pedig AM3 tápközegek esetén is.

C. albicans, *C. krusei* és a *C. dubliniensis* fajok esetében a 48 órás inkubációs idő után leolvasott MIC érték fölötti üregektől kezdve, a teljes tartalmat (200 μ L) pipettával összeszuszpendáltuk, majd 2-2 Sabouraud-agarra oltottuk ki (100-100 μ L). A kioltott cseppet hagytuk megszáradni, majd a gombasejteket steril kaccsal kihúztuk a táptalaj teljes felületén. A kinőtt telepek megszárolása 48 óra múlva történt meg, szintén 35 °C-on történő inkubáció után.

A *C. tropicalis* esetében az MFC értéket 24 óra után is meghatároztuk 10^5 CFU/mL emelt csíraszám alkalmazásával.

A *C. dubliniensis* és a *C. tropicalis* esetében a „trailing” növekedés előfordulási gyakoriságát is (folyamatos növekedés a MIC feletti koncentrációkon) megvizsgáltuk RPMI-1640 és AM3 tápfolyadékokban.

Az idő-ölés görbék meghatározása

A vizsgálatok Klepser és munkatársai módszerén alapultak. A kísérletek elkezdése előtt megvizsgáltuk, hogy a CAS különböző koncentrációinak (0,5-16xMIC) jelenléte hogyan befolyásolja a kezdő csíraszámot (antifungális „carryover”). A kezdő csíraszám 500 CFU/mL volt. A gombaszuszpenzió elkészítése után 4x30 μ L-t rögtön kioltottunk Sabouraud-agarra majd a kinőtt telepeket 48 órás inkubáció után megszároltuk. Antifungális „carryover”-t akkor észlelünk, ha a kinőtt gombatelepek száma több mint 25%-kal kisebb volt különböző gyógyszerkoncentrációk esetében a kontroll csövékéhez képest.

A kezdő csíraszám minden esetben 10^5 CFU/mL volt, amelyet kvantitatív kioltással ellenőriztünk. A CAS koncentráció értékei *C. tropicalis* esetében 0,024-12,5 mg/L, a *C. albicans*, *C. krusei* és a *C. dubliniensis* fajok esetében 0,06-16 mg/L voltak.

Az elkészített gombaszuszpenziókat folyamatos rázatás mellett, sötétben 35 °C-on inkubáltuk, és a csövekből steril körülmények között előre meghatározott időpontokban 100 μ L-t vettünk

ki, és a kimért mintákból fiziológias sóoldattal sorozathígítást (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) készítettünk. Abban az esetben, ha a kitenyésztett csíraszám várhatóan kevesebb volt, mint 1000 CFU/mL (jelentősebb ölü hatás), akkor a szuszpenziókból direkt kioltást is alkalmaztunk, azaz hígítási sorozat készítése nélkül oltottunk ki Sabouraud-agarra.

A kioltási időpontok a *C. tropicalis* és *C. dubliniensis* esetében 0, 2, 4, 8, 12, 24 és 48 óra, a *C. albicans* és *C. krusei* esetében 0, 4, 8, 12, 24 és 48 óra voltak, melyeket a megfelelő tesztörzseken végzett előzetes mérések alapján határoztunk meg.

A kioltás során a hígítási sorozatokból $4 \times 30 \mu\text{L}$ mintákat vettünk, és Sabouraud-agar felületére cseppentettük azokat. A mintákat hagytuk szobahőmérsékleten megszáradni, majd 48 órán keresztül $35 \text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk, a kinőtt telepeket megszámláltuk, és a kapott csíraszámából a hígításokat figyelembe véve meghatároztuk az élő gombasejtek számát.

A *C. tropicalis* esetén még azt is vizsgáltuk, hogy 1 mg/L amphotericin B (AMB), 1 mg/L flukonazol (FLU) és 1 mg/L 5-fluorocitozin (5-FC) hozzáadása a nagy koncentrációjú CAS-t tartalmazó csövekhez (6-12,5 mg/L) hogyan befolyásolja a PG-t, illetve képes-e annak felfüggesztésére.

Minden vizsgálatot legalább kétszer végeztünk el, majd a kapott eredményeket átlagoltuk.

Az eredmények értékelésének szempontjai

Vizsgálataink során meghatározásra került mind a négy faj esetében a MIC érték 24 óra elteltével (részleges gátlás, MIC_{PI}, NCCLS M27-A2 ajánlása szerint). A MIC érték annál a gyógyszer koncentrációnál volt, ahol a kontrollhoz képest szemmel látható turbiditáscsökkenés volt észlelhető.

A MIC érték meghatározása a *C. albicans* és a *C. krusei* fajok esetében 48 óra elteltével is megtörtént (teljes gátlás, MIC_{TI}). Ilyenkor a MIC értéket az első teljesen tiszta üregnél kaptuk meg.

A PG-t úgy definiáltuk, hogy a részleges gátlással meghatározott MIC érték után legalább két tiszta ürege van szükség a táplemezen, és utána megint növekedést kell tapasztalnunk a nagyobb koncentrációk esetében. Tehát van növekedés a legalacsonyabb, nincs növekedés a köztes koncentráción, de magasabb koncentráción a növekedés újból megjelenik.

EREDMÉNYEK

A minimális gátló koncentráció meghatározása során kapott eredmények

A *C. tropicalis* esetében függetlenül az alkalmazott közegtől (RPMI-1640, AM3) normál (10^3 CFU/mL) és emelt (10^5 CFU/mL) kezdő csíraszám esetén a MIC_{PI} érték 0,024 mg/L-nek adódott.

C. dubliniensis vizsgálatánál RPMI-1640 táptalaj alkalmazásánál a MIC_{PI} értékek 0,06-0,25 mg/L között változtak normál kezdő csíraszám esetében, kivéve a 4. számú izolátumot, amelynél ez az érték 8 mg/L-nek adódott. Nagyobb kezdő csíraszám esetén (10^5 CFU/mL) a MIC_{PI} érték egy-két hígítási fokot emelkedett (0,12-0,25 mg/L), de a 4. számú izolátumnál a MIC_{PI} érték nem változott (8 mg/L). AM3 alkalmazásakor függetlenül az alkalmazott csíraszámától a MIC_{PI} érték egységesen 0,03 mg/L-nek adódott.

A *C. albicans* esetén a MIC értékeket 24 (MIC_{PI}, részleges gátlás) és 48 óra múlva is meghatároztuk (MIC_{TI}, teljes gátlás). A MIC_{PI} értékek leolvasás után 0,015-0,06 mg/L-nek adódtak RPMI-1640 táptalaj alkalmazásakor. AM3 használatakor a kapott értékek valamivel alacsonyabbak lettek (0,015-0,03 mg/L). Negyvennyolc óra múlva a MIC_{TI} 0,25-1 mg/L között volt RPMI-1640 esetében. AM3-t alkalmazva a kapott értékek kisebbnek adódtak (0,015-0,06 mg/L).

C. krusei esetén a 24 órás, részleges gátlási kritériummal leolvasott MIC értékek RPMI-1640 tápközeg alkalmazásánál 0,12-0,25 mg/L között változtak, míg AM3-ban egységesen 0,12 mg/L-nek adódott. A 48 órás leolvasást követően a MIC_{TI} RPMI-1640 és AM3 esetén 2 mg/L-nek, illetve 0,25 mg/L-nek adódott.

Paradox növekedés vizsgálata a minimális gátló koncentráció értékeinek alapján

C. albicans esetében a 14057-es számú izolátum mindkét tápközegben mutatta a PG-t.

A *C. krusei* vizsgálatánál csak a tesztörzs (ATCC 6258) mutatott PG-t, de csak az AM3 alkalmazása során.

A *C. tropicalis* vizsgálata során RPMI-1640 tápközeg alkalmazásánál két izolátumnál (4. és 15. izolátumok) tapasztaltunk PG-t 12,5 mg/L CAS koncentráción (10^3 CFU/mL kezdő csíraszám esetében).

Emelt csíraszám alkalmazásakor a *C. tropicalis* izolátumok egységesen „trailing” növekedést mutattak, a legmagasabb koncentráció értékig (12,5 mg/L).

A *C. dubliniensis* esetében RPMI-1640 tápközeg használatakor emelt csíraszámnál nem tapasztaltunk PG-t. AM3 alkalmazása során emelt csíraszám alkalmazásakor két izolátum esetén 48 órás inkubáció után tapasztaltunk PG-t. A „trailing” növekedés az AM3 táptalaj esetén egyáltalán nem volt tapasztalható, függetlenül a kezdő csíraszámától és az inkubációs időtől. RPMI-1640 használatánál viszont az összes izolátumnál megjelent a „trailing” növekedés 48 órás inkubációt követően.

Paradox növekedés vizsgálata a minimális fungicid koncentráció értékeinek alapján

A *C. albicans* és a *C. krusei* vizsgálata során RPMI-1640 táptalaj használatakor az MFC értékek 0,5-1 mg/L-nek, illetve 1-2 mg/L-nek adódtak, 48 órás inkubáció után. AM3 alkalmazásakor ezen értékek *C. albicans* esetében 0,03 mg/L-nek, *C. krusei* vizsgálatokor 0,25-0,5 mg/L-nek bizonyultak. Az MFC teszt során egy *C. albicans* izolátum (14057. számú), és egy *C. krusei* izolátum (4363. számú) mutattak PG-t RPMI-1640 alkalmazásánál.

A *C. dubliniensis* vizsgálatánál az MFC értékek RPMI-1640 táptalajban nagyobbak voltak, mint 8 mg/L minden izolátum esetében. AM3-t alkalmazva tápközegként, az összes MFC érték $\leq 0,12$ mg/L-nek adódott, és a 4. izolátum kivételével az összes izolátum mutatta a PG-t.

A *C. tropicalis* esetében összesen hat izolátum nőtt 24 óra múlva 6,25 mg/L CAS koncentrációnál, illetve, 48 óra múlva ez a szám hétre változott. A hetes számú izolátum kivételével mind 24, mind, pedig 48 óra múlva nőttek az izolátumok 12,5 mg/L CAS koncentráción. A 16 izolátumból 15 mutatta tehát, a PG jelenséget az MFC teszt során.

AM3 tápközegben az MFC értékek $\leq 0,09$ mg/L-nek adódtak, ami megfelelt a $\leq 4 \times \text{MIC}$ értéknek (csak alacsony koncentráción volt növekedés). A 6. izolátum PG-t mutatott (növekedés 6,25 és 12,5 mg/L-es CAS koncentrációnál). Azaz, AM3 tápközeg esetén a CAS ölési képessége fokozódott, és PG csupán egy esetben jelentkezett.

Az idő-ölés görbék vizsgálatakor kapott eredmények

„Antifungális carryover” nem volt tapasztalható a kísérlet során.

C. tropicalis esetében a kapott eredmények megerősítették a 24, illetve a 48 órás leolvasás után MFC-vel kapott eredményeket. Alacsony CAS koncentráció esetén fungisztikus hatást észleltünk, majd fungicid aktivitást tapasztaltunk a köztes koncentrációkon ($\leq 3,12$ mg/L), viszont magas CAS értékeknél (6,25-12,5 mg/L) újra csak fungisztikus hatás volt megfigyelhető. A 12,5 mg/L koncentráción nőtt telepekkel újból elvégezve az idő-ölés görbéket az eredetivel megegyező görbéket kaptunk. Az idő-ölés görbék eredményei jól korreláltak az MFC teszt eredményeivel, kivéve a 4. izolátumot és az ATCC 750 tesztörzset

RPMI-1640 tápközeg alkalmazásánál. A tesztörzs az MFC teszt során növekedést mutatott minden vizsgált CAS koncentráción 24, illetve 48 óra múlva is. Az idő-ölés görbék vizsgálata során 256xMIC értéknél, 24 óra elteltével fungicid hatás jelentkezett, de 512xMIC tartományban újbóli növekedést tapasztaltunk. Hasonló, bár kisebb eltérés volt a 4. izolátum esetében is.

FLU hozzáadása (1 mg/L) a kiindulási inokulomokhoz, függetlenül az alkalmazott tápközegektől 24 óra múlva az összes klinikai izolátum esetében megszüntette a PG-t (az azonos koncentrációjú AMB, illetve 5-FC hatástalan volt). Ettől különböző eredményeket kaptunk az ATCC 750 tesztörzs esetén, amikor is 1 mg/L AMB hozzáadása szüntette meg a PG-t (ez esetben az FLU és az 5-FC hatástalan volt, azaz a PG továbbra is megfigyelhető volt).

C. dubliniensis vizsgálata során kétféle típusú idő-ölés görbét kaptunk a hat klinikai izolátum és a CD36 tesztörzs esetében. RPMI-1640-ben fungisztatikus hatást tapasztaltunk, de AM3-ban ugyanazon törzsek tipikus PG-t mutattak. Azaz fungicid hatást kaptunk 0,12-4 mg/L (4x-128xMIC értékek) CAS koncentrációnál 12 óra múlva, alatta viszont csak fungisztatikus aktivitás mutatkozott. A 8-16 mg/L (256-512x MIC) CAS értékeknél is csak a fungisztatikus hatást lehetett tapasztalni.

A 4. izolátum eltérően viselkedett a többiekhez képest. Ebben az esetben a MIC érték eleve 8 mg/L- nek adódott. Fungicid hatást kaptunk 8-16 mg/L (1x-2x MIC) CAS koncentrációknál, az ettől alacsonyabb koncentrációkon fungisztatikus hatást mértünk RPMI-1640 tápközeg esetében. AM3 alkalmazásánál a CAS fungicid volt minden alkalmazott koncentráción, 24 óra elteltével. PG ez esetben nem volt megfigyelhető.

A *C. albicans* vizsgálatánál több különböző típusú ölési görbét kaptunk, a különböző tápoldatok használatánál. A referenciaként alkalmazott tesztörzs (ATCC 14053) PG-t mutatott mindkét alkalmazott médium esetében. Fungicid hatást tapasztaltunk már 0,12 mg/L CAS koncentrációnál, és ezen érték feletti tartományban mindkét vizsgált médiumban fungisztatikus hatás volt megfigyelhető, RPMI-1640 alkalmazásakor 1-16 mg/L koncentrációk között, illetve 8-16 mg/L értéktartományban AM3 esetében.

Hasonló helyzet volt megfigyelhető két klinikai izolátum esetében (7111. és 10598. számú izolátumok), RPMI-1640 táptalaj használatakor (fungisztatikus hatás) bármely tesztelt koncentráción 24 óra múlva. Negyvennyolc órás inkubációs idő után mindkét izolátum 16 mg/L-es CAS koncentráción elpusztult (fungicid hatás). Alacsonyabb koncentráción fungisztatikus hatást tapasztaltunk.

AM3 alkalmazásakor a 7111. számú izolátum esetén már 12 óra múlva 0,12-8 mg/L koncentráció tartományban fungicid hatás volt látható, majd 24 óra elteltével 16 mg/L koncentráción fungicid hatás volt tapasztalható (a koncentráció emelésével az ölés lassabb volt). A 10598. számú izolátum vizsgálatakor 24 óra múlva PG-t tapasztaltunk 16 mg/L koncentrációnál, ennél alacsonyabb CAS értékeknél viszont fungicid hatás volt detektálható, majd 48 óra után $\geq 0,5$ mg/L koncentráción fungicid hatást mutatott.

A 8812. és 21186. izolátumok fungisztatikus hatást mutattak RPMI-1640 tápközegben 24 óra elteltével, majd tipikus PG volt megfigyelhető 48 óra múlva. A vizsgált koncentráció tartományokban 0,5-2 mg/L-nél fungicid hatást, 4-16 mg/L-nél és 0,12 mg/L CAS értékeknél fungisztatikus aktivitást tapasztaltunk.

AM3 alkalmazásakor a 8812. számú izolátum 0,12-16 mg/L tartományban fungicid, 16 mg/L-nél fungisztatikus aktivitást mutatott 24 óra elteltével, majd 48 óra múlva már $\geq 0,12$ mg/L CAS koncentrációnál teljes ölés volt megfigyelhető (fungicid hatás).

A 14057. számú izolátum minden alkalmazott CAS koncentrációnál fungisztatikus ölési görbét mutatott RPMI-1640 tápközegben. AM3 használata során tipikus PG görbét kaptunk. Ebben az esetben 24 óra elteltével 4-16 mg/L tartományban fungisztatikus hatást tapasztaltunk, ≤ 2 mg/L értéknél a hatás egyértelműen fungicid volt. 48 óra után az ölü aktivitás fokozódását tapasztaltuk, ≤ 8 mg/L értéknél fungicid, míg 16 mg/L esetén fungisztatikus hatást észleltünk.

A három *C. krusei* klinikai izolátum esetén, ≥ 2 mg/L CAS értékeknél 24, illetve 48 óra múlva is fungicid aktivitást tapasztaltunk RPMI-1640 tápközegben. AM3 alkalmazásánál a CAS ölési aktivitása fokozódott 0,12-0,5 mg/L tartományban fungicid volt 24 óra elteltével, majd 48 óra múlva a fungicid hatás már $\geq 0,12-0,25$ mg/L CAS koncentrációkon jelentkezett.

Az ATCC 6258 tesztörzs vizsgálatánál 24 óra múlva $\geq 0,5$ mg/L CAS koncentrációnál fungicid aktivitást tapasztaltunk RPMI-1640 használatánál. Negyvennyolc óra elteltével a fungicid hatás $\geq 0,25$ mg/L-nél jelentkezett. Hasonló értékeket kaptunk AM3 használata során is. A *C. krusei* vizsgálata során paradox növekedést egy esetben sem tapasztaltunk.

MEGBESZÉLÉS

Az echinocandinok klinikai használatba történő bevezetése örvendetes volt az új évezred elején, hiszen az invazív gombafertőzések által okozott mortalitás mind a neutropeniás, mind, pedig a nem-neutropeniás betegek esetén továbbra is magas volt, annak ellenére, hogy a FLU már több mint tíz éve, széleskörben használatos volt a kezelésben. Bár az echinocandinok bizonyos *Aspergillus* fajok ellen is hatékonyak, szerepük döntően az invazív *Candida* fertőzésekre korlátozódik.

Az echinocandinok esetén jelenleg három fő kérdés merül fel a kutatások, illetve a klinikai használat során, amelyek egymással szorosan összefüggnek: milyen érzékenységi határértéket válasszunk a rezisztens izolátumok felismerésére, mi lehet az optimális dozírozás, és lehet-e a PG-nek szerepe a kezelés során.

Az echinocandinok érzékenységi határértéke („break-point” az angolszász irodalomban) jelenleg 2 mg/L. Ez az érték több ezer klinikai izolátum MIC meghatározása, a MIC értékek eloszlása, valamint a MIC érték és a klinikai siker valószínűsége alapján került meghatározásra. Jól ismert, hogy a *Candida* fajok többsége alacsony MIC₉₀ értékkel rendelkezik mindhárom echinocandin iránt, és az is, hogy a *C. parapsilosis* és a *C. guilliermondii* fajok MIC₉₀ értéke relatíve magas (1-2 mg/L). A „psilosis” csoport esetén ennek az, az oka, hogy a glükán szintetáz enzimben prolin-alanin aminosav -csere figyelhető meg a 660-adik aminosavban. *C. guilliermondii* esetén a legfontosabbnak a 642-edik aminosav-csere (metionin-leucinra) tűnik. *In vivo* állatkísérletek igazolták eddig a *C. parapsilosis* és a *C. guilliermondii* fajok csökkent érzékenységét az echinocandinok iránt. Mindazonáltal, a *C. parapsilosis*, mint faj sokkal kisebb virulenciával rendelkezik, mint pl. a *C. albicans*, ez lehet a klinikumban hatásos echinocandin terápia kulcsa ezen, faj ellen.

A rutin, klinikai anyagból izolált *Candida* fajok MIC₉₀ értéke $\leq 0,25$ mg/L, a *C. parapsilosis* és a *C. guilliermondii* fajokat leszámítva. Ezért logikusnak tűnik, hogy a *C. parapsilosis* és a *C. guilliermondii* természetes, csökkent érzékenységét az echinocandinok iránt elkülönítsük a terápia során, a szekunder módon kialakult valódi echinocandin rezisztenciától. Ennek első lépése a pontos fajazonosítás. Azaz, ha tudjuk, hogy a kérdéses fajok a *C. parapsilosis* vagy a *C. guilliermondii*, akkor nem az echinocandinok lesznek az elsőként alkalmazott antifungális szerek. Másodlagos rezisztencia leggyakrabban *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. krusei* esetén figyelhető meg, amelyeknek a MIC₉₀ értéke eredendően alacsony. Ha a pontos

fajazonosítás után a MIC érték ezen fajok iránt relatíve magas ($\geq 0,5$ mg/L), akkor valószínűleg szerzett rezisztenciáról van szó.

Az optimális dozírozás a következő fontos kérdés. Echinocandintól függően jelenleg a napi 1-2 mg/kg a javasolt adag. Ezeknek a dózisoknak a hatékonyságát *in vivo* farmakokinetikai és farmakodinámiás adatok is alátámasztják. Ezeket a dózisokat a betegek jól tolerálják, de sajnos a mortalitás jelentősen nem csökkent az 1990-es évekhez képest. Ezért vetődött fel a dózisémelés, mint lehetséges megoldás a klinikai siker növelése érdekében. Pappas és munkatársai mikafungin esetén, bebizonyították, hogy a napi 8 mg/kg-os dózis, legalább hét napon keresztül alkalmazva is biztonságos, a mellékhatások nem fordultak szignifikánsan gyakrabban elő, mint a napi 100 mg-os kontroll-csoportban. Hasonló eredményeket lehetett látni Betts és munkatársainak a vizsgálataiban is, akik a napi standard, 50 mg-os CAS terápiával hasonlították össze a háromszoros, napi 150 mg-os CAS terápiát. A dózis emelése számszerűleg növelte a terápiás sikert *C. albicans* és *C. parapsilosis*-sal fertőzött betegek esetén, míg *C. tropicalis* és *C. glabrata* esetén több volt a terápiás sikertelenség.

A PG mint a bevezetőben is említettem egy *in vitro* észlelt jelenség, amelynek klinikai jelentősége nem tisztázott. A mikrodilúciós módszerrel végzett MIC meghatározás során, különösen nem gyakorlott leolvasók esetén zavarhatja a MIC leolvasás eredményét. Ugyanakkor a pontos MIC meghatározást a PG mellett a „trailing” hatás is zavarhatja. A „trailing” definíció szerint jól látható növekedést jelent a MIC érték feletti üregekben, de idő-ölés görbék és *in vivo* eredmények is azt mutatják, hogy ezek az izolátumok reagálnak az antifungális terápiára. A „trailing” jelenség az echinocandinok esetén is megfigyelhető. Sőt, kezdetben a MIC meghatározás során, a teljes gátlás volt a végpont, azaz a részleges gátláshoz képest a MIC érték, akár 4-5 hígítási fokkal is magasabb volt. Később észlelték, hogy a részleges gátlás utáni növekedés az üregekben nem valódi növekedés, hanem elpusztult gombasejt-törmelék. Így a későbbiekben a részleges gátlás lett a MIC leolvasás végpont-kritériuma.

Vizsgálataink során a négy faj esetén alacsony (10^3 CFU/mL) kezdő-csírászám alkalmazásakor csak kis százalékban tapasztaltunk PG-t a MIC meghatározás során, függetlenül a használt tesztközegtől. A kezdő csírászám emelésének elméletileg fokoznia kellett volna azon gombasejtek számát, amelyek mutatják a PG-t, de RPMI-1640 közeg inkább a „trailing” jelenség gyakorisága nőtt. AM3 alkalmazása során a „trailing” visszaszorult így könnyebb volt a MIC leolvasása is.

C. tropicalis izolátumok esetén az alacsonyabb és a legnagyobb koncentrációkon előforduló csökkent ölést 24 és 48 óra után tápközegtől függetlenül is ki tudtuk mutatni, az MFC teszttel. Az ölés AM3 alkalmazásánál alacsonyabb koncentrációkon következett be, megerősítve korábbi szerzők megfigyelését, hogy AM3-ban az antifungális szerek gyorsabban ölik a gombákat, mint RPMI-1640-ben. MFC teszt alkalmazásával a CAS RPMI-1640-ben, a *C. dubliniensis* izolátumok kivételével általában fungicidnak bizonyult. AM3 közegben az MFC teszt hasznosnak tűnik a PG kimutatására, ami különösen a *C. dubliniensis* izolátumoknál volt feltűnő (az MFC > 8 mg/L RPMI-1640-ben, míg AM3-ban tipikus PG 48 óra után egy izolátumot kivéve). Az idő-ölés görbék megerősítették, illetve pontosították az MFC kísérletekben kapott eredményeinket. Véleményünk szerint a PG pontos előfordulási gyakoriságát az egyes *Candida* fajok esetén az idő-ölés görbék segítségével kell megállapítani. Mindazonáltal, az ölés időbeli alakulásáról is felvilágosítást ad ez a módszer. Rövidebb (24 óra) inkubációs idő után, fungisztikus, esetleg PG hatás, míg hosszabb (48 óra) inkubációs idő után fungicid esetleg PG hatás jelentkezett. Azaz, hosszabb inkubációs idő után a fungisztikus hatás átmehet PG-be (alacsonyabb koncentrációkon az ölés nő), míg a PG átmehet teljes fungicid hatásba (az ölés magasabb koncentrációkon is létrejön). Ez a tendencia főleg *C. albicans* és a vele szoros rokonságban levő *C. dubliniensis* esetén volt jól látható. Mindkét faj esetén a jelenséget a tápközeg is jelentősen befolyásolta (AM3-ban a CAS gyorsabban ölt). Sőt, az egyik *C. dubliniensis* izolátum esetén AM3-ban nemcsak a MIC volt sok hígítási fokkal alacsonyabb, mint RPMI-1640-ben (8 mg/L) hanem közepes koncentrációkon fungicid hatás jelentkezett. A legmagasabb koncentrációkon a gyengébb ölést (PG) ugyanennél az izolátumnál továbbra is megfigyelhettük AM3-ban is. Sajnos, a jelenség molekuláris hátterét nem volt módunk tanulmányozni.

Az echinocandinok *in vivo* hatása attól függ, hogy a fertőzés helyén elég nagy lesz-e a gyógyszer-koncentráció. Legutóbb, Andes és munkatársai határozták meg egér-modellükben mindhárom echinocandin 5, 20 és 80 mg/kg egyszeri dózisainak 24 órás echinocandin-szintjét a plazmában. Figyelemre méltó, hogy akár egyszeri, 5 mg/kg-os caspofungin dózis is 18 mg/L csúcskoncentrációt eredményez. Figyelembe véve, hogy az echinocandinok esetén 97-99 %-os a szérumban a fehérjékhez kötődés, visszaszámolva, valószínűsíthető, hogy 0,1-0,2 mg/L-nél nem lesz nagyobb a szabad, azaz aktív echinocandin koncentráció.

Érdeemes azonban szétválasztani a szérumban mérhető, egyszeri dózis után mérhető echinocandin szinteket, a tartósan nagyobb dózisban adagolt szérumszintektől. Tartós adagolásakor elméletileg lehetőség van arra, hogy az echinocandinok fehérjéhez nem kötött

frakciója a szérumban növekedjen, így elérjen egy olyan szintet, ahol a kórokozó ellen nem érvényesül az öló hatás. Sajnos, tartósan nagyobb dózisban adagolt echinocandin terápia közben a szérum-echinocandin szintet még nem vizsgálták. Másik fontos tényező, hogy a gombák, nemcsak a vérben fordulhatnak elő, hanem akármelyik belső szervünk invázióját előidézhetik, ahonnan kiirtásuk sokkal nehezebb lehet. Az echinocandinok a vérből a szövetekbe lépnek fel, majd onnan, mint depóból, térnek vissza a vérbe. Ez a jellegzetes farmakokinetika teszi lehetővé a napi egyszeri echinocandin adagolást. Nem tudjuk azonban (nincs irodalmi adat), hogy a szövetekben, különösen tartósan nagyobb napi dózisok esetén milyen magas az echinocandin-szint, milyen mértékű a fehérjéhez kötődés. Elméleti lehetőség van arra, hogy a szövetekben kialakuljon egy olyan szabad, echinocandin koncentráció, ahol a kórokozó életben marad. Így véleményünk szerint, a PG jelentőségét nem lehet egyértelműen kizárni a terápiás sikertelenségek egyik okaként.

Tartósan nagyobb dózisú echinocandin terápia nem növelte szignifikánsan az invazív candidiasisban szenvedő betegek túlélését, miközben az eleve drága napi terápiás költség 2-3-szorosára nőtt. Ráadásul bizonyos fajok esetén nem lehet kizárni a PG szerepét a sikertelen terápiában. Ezért a tartósan nagyobb dózisú echinocandin terápiának úgy tűnik, hogy több a hátránya, mint az előnye. Következésképp a mortalitás csökkentése érdekében talán helyesebb, ha az echinocandinokat normál dózisban adagoljuk, és esetleg AMB-vel vagy valamilyen triazollal kombináljuk. Az AMB, a FLU, az 5-FC és a posakonazol az echinocandinokkal nem mutatnak antagonista hatást, sőt saját eredményeink azt is mutatják, hogy ezek a gyógyszerek megszüntetik az *in vitro* észlelt PG-t. Így a jövőben a kombinációs terápiának lehet, hogy nagyobb szerepe lesz az antifungális terápiában.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az echinocandinok csoportjába tartozó caspofungin mind az orofaringeális, mind a szisztémás *Candida* fertőzések kezelésére is alkalmazható új antifungális szer. Az elvégzett *in vitro* érzékenységi vizsgálatok során számos szerző tapasztalt magasabb echinocandin koncentráció tartományokban növekedést (Eagle-hatást), de a jelenség pontos előfordulási gyakorisága nem volt ismert.

Kísérleteink során orofaringeális szempontból is kiemelkedő jelentőséggel bíró *Candida* fajok (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* és *C. tropicalis*) esetén vizsgáltuk a nagy dózisú caspofungin alkalmazásakor fellépő paradox növekedést. A jelenséget, minimális gátló koncentráció meghatározása mellett a caspofungin által kiváltott ölés segítségével is vizsgáltuk a minimális fungicid koncentráció és az idő-ölés görbék meghatározása által két különböző tápközegben (RPMI-1640, antibiotikum médium 3).

Munkánk során a következő fontos eredményeket kaptuk:

1. Antibiotikum médium 3 közegben a minimális gátló koncentráció értékek alacsonyabbnak adódtak és a pontos leolvasást gyakran zavaró „trailing” jelenség sem jelentkezett az RPMI-1640-el összehasonlítva a négy vizsgált faj esetén.
2. A minimális fungicid koncentráció és az idő-ölés görbék segítségével *C. tropicalis* izolátumok vizsgálatakor egyértelműen bebizonyítottuk, hogy a paradox növekedés, mint csökkent ölési képesség figyelhető meg nagy caspofungin koncentráció jelenlétében, tápközegtől függetlenül.
3. *C. albicans* és *C. dubliniensis* izolátumok esetén RPMI-1640 közegben döntően fungisztikus hatást észleltünk, de az ölő hatás antibiotikum médium 3 közegben 24 óra, de főleg 48 óra után fokozódott, ami paradox növekedés vagy fungicid hatás formájában jelentkezett.
4. Az idő-ölés görbék tápközegtől függetlenül egyértelműen bizonyították, hogy a paradox növekedés *C. krusei* esetén nem fordul elő.
5. Munkánkban, a paradox növekedés tanulmányozására először alkalmaztuk a minimális fungicid koncentráció meghatározását és az idő-ölés görbék felvételét.

Eredményeink döntően megerősítették, illetve pontosították korábbi szerzők vizsgálatainak eredményeit a paradox növekedés előfordulását illetően. Preklinikai és klinikai vizsgálatoknak kell tisztázni a nagy caspofungin koncentráció jelenlétében *in vitro* kialakuló paradox növekedés *in vivo* jelentőségét az echinocandinokkal történő biztonságos terápia érdekében.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezést megalapozó in extenso tudományos közlemények

1. Sóczó G., Kardos G., **Varga I.**, Kelentey B., Gesztelyi R., Majoros L. 2007. In vitro studies with *C. tropicalis* isolates exhibiting paradoxical growth in the presence of high concentrations of caspofungin. Antimicrob. Agents Chemother. 51(12): 4474-4476. **IF: 4,39 Független idéző: 3**
2. **Varga I.**, Sóczó G., Kardos G., Majoros L. 2008. Time-kill studies investigating the killing activity of caspofungin against *Candida dubliniensis*: comparing RPMI-1640 and antibiotic medium 3. J. Antimicrob. Chemother. 62: 149-152. **IF: 4,328 Független idéző: 1**
3. **Varga I.**, Sóczó G., Kardos G., Kemény-Beke A., Kelentey B., Márton I., Majoros L. 2009. Differences in killing activity of caspofungin and paradoxical growth between *C. albicans* and *C. krusei* clinical isolates in different media. J. Chemother. 21(1): 36-41. **IF: 1,166 Független idéző: 0**

További in extenso tudományos közlemények

1. **Varga I.**, Sóczó G., Kardos G., Borbély A., Szabó Z., Kemény-Beke A., Majoros L. 2008. Comparison of killing activity of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. J. Antimicrob. Chemother. 62: 1466-1468. **IF:4,328 Független idéző: 2**
2. Sóczó G., Kardos G., McNicholas P. M., Balogh E., Gergely L., **Varga I.**, Kelentey B., Majoros L. 2007. Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time-kill test against nine *Candida* species. J. Antimicrob. Chemother. 60: 1004-1009. **IF: 4,038 Független idéző: 12**

A közlemények összesített impakt faktora: **18,25**

Iktatószám: DEENKÉTK /41/2011.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Varga István

Neptun kód: GWPZYX

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Varga, I.,** Sóczó, G., Kardos, G., Kemény-Beke, Á., Kelentey, B., Márton, I., Majoros, L.: Differences in killing activity of caspofungin and paradoxical growth between *Candida albicans* and *C. krusei* clinical isolates in different media.
J. Chemother. 21 (1), 36-41, 2009.
IF:1.166
2. **Varga, I.,** Sóczó, G., Kardos, G., Majoros, L.: Time-kill studies investigating the killing activity of caspofungin against *Candida dubliniensis*: Comparing RPMI-1640 and antibiotic medium 3.
J. Antimicrob. Chemother. 62 (1), 149-152, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn144>
IF:4.328
3. Sóczó, G., Kardos, G., **Varga, I.,** Kelentey, B., Gesztelyi, R., Majoros, L.: In vitro study of *Candida tropicalis* isolates exhibiting paradoxical growth in the presence of high concentrations of caspofungin.
Antimicrob. Agents Chemother. 51 (12), 4474-4476, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00880-07>
IF:4.39

További Közlemények

4. **Varga I.,** Kelentey B.: A superficialis és szisztémás *Candida* infekciók korszerű terápiája.
Magyar Fogorv. 18 (1), 20-23, 2009.



5. **Varga, I.**, Sóczó, G., Kardos, G., Borbély, Á., Szabó, Z., Kemény-Beke, Á., Majoros, L.: Comparison of killing activity of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*.
J. Antimicrob. Chemother. 62 (6), 1466-1468, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn403>
IF:4.328
6. Sóczó, G., Kardos, G., McNicholas, P.M., Balogh, É., Gergely, L., **Varga, I.**, Kelentey, B., Majoros, L.: Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time-kill test against nine *Candida* species.
J. Antimicrob. Chemother. 60 (5), 1004-1009, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm350>
IF:4.038

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.03.17

