

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A CASPOFUNGIN FARMAKODINÁMIÁJÁNAK VIZSGÁLATA *CANDIDA ALBICANS*, *C. KRUSEI* ÉS *C. INCONSPICUA* IZOLÁTUMOK ELLEN

Kovács Renátó László

Témavezető: Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Fontosabb rövidítések	4
I. Bevezetés	6
II. Irodalmi áttekintés	9
<i>II.1. A Candida fajok általános jellemzése és virulenciája.....</i>	<i>9</i>
<i>II.2 A Candida fajok által okozott megbetegedések.....</i>	<i>12</i>
<i>II.3 A Candida fajok epidemiológiája</i>	<i>14</i>
<i>II.4. A szisztémás Candida infekciók kezelésére szolgáló antifungális szerek.....</i>	<i>17</i>
<i>II.4.1. Echinocandinok.....</i>	<i>18</i>
II.4.1.1. Caspofungin	21
II.4.1.2. Echinocandin rezisztencia	23
II.4.1.3. Fajspecifikus echinocandin breakpoint-ok alkalmazása	26
II.4.1.4. A szérum echinocandin farmakodinámiára kifejtett hatása	28
III. Célkitűzések.....	30
IV. Anyagok és módszerek.....	31
<i>IV.1. A vizsgált izolátumok.....</i>	<i>31</i>
<i>IV.2. A caspofungin minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása</i>	<i>31</i>
<i>IV.3. Idő-ölés (time-kill) görbék felvétele.....</i>	<i>32</i>
<i>IV.4. A posztantifungális hatás vizsgálata</i>	<i>33</i>
<i>IV.5. Az in vitro adatok elemzése.....</i>	<i>33</i>
<i>IV.6. In vivo kísérletek menete.....</i>	<i>34</i>
IV.6.1. A kísérletben felhasznált egerek	34
IV.6.2. A fertőzés menete	34
IV.6.3. Antifungális terápia	35
IV.6.4. Statisztikai elemzés.....	35
4.7. Az in vitro és in vivo kísérletek menete képekben	36
V. Eredmények.....	38
<i>V.1. A caspofungin iránti érzékenység meghatározása makrodilúciós módszerrel</i>	<i>38</i>
<i>V.2. Az idő-ölés kísérletek és posztantifungális hatás vizsgálatok eredményei RPMI-1640-ben Candida albicans izolátumok ellen.....</i>	<i>39</i>
<i>V.3. Az idő-ölés kísérletek és posztantifungális hatás vizsgálatok eredményei RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében Candida albicans izolátumok ellen.....</i>	<i>40</i>
<i>V.4. Az idő-ölés, valamint a posztantifungális hatás vizsgálatokban bekövetkező sejtszámváltozások összehasonlítása a Candida albicans izolátumok esetében</i>	<i>43</i>
<i>V.5. A caspofungin által kifejtett ölési ráta vizsgálata Candida albicans izolátumok ellen.....</i>	<i>44</i>
<i>V.6. A caspofungin in vitro hatékonyságának meghatározása idő-ölés kísérletekkel RPMI-1640- ben Candida krusei és Candida inconspicua izolátumok ellen</i>	<i>47</i>
<i>V.7. A caspofungin in vitro hatékonyságának meghatározása idő-ölés kísérletekkel RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében Candida krusei és Candida inconspicua izolátumok ellen..</i>	<i>48</i>
<i>V.8. A caspofungin által kifejtett ölési ráta vizsgálata Candida krusei és Candida inconspicua izolátumok ellen.....</i>	<i>50</i>
<i>V.9. A caspofungin in vivo hatékonyságának vizsgálata Candida krusei izolátumok ellen</i>	<i>54</i>
<i>V.10. A caspofungin in vivo hatékonyságának vizsgálata Candida inconspicua izolátumok ellen </i>	<i>55</i>
<i>V.11. A kísérleti munkában részt vevő társszerzők munkájának ismertetése.....</i>	<i>57</i>
VI. Megbeszélés.....	58
VII. Összefoglalás	65

VIII. Summary	66
IX. Köszönetnyilvánítás	67
X. Irodalomjegyzék.....	68
XI. Tárgyszavak-Keywords	84
XII. Függelék.....	85

Fontosabb rövidítések

AMB	amphotericin B
ANI	anidulafungin
AUC	area under the curve = görbe alatti terület
AUC/MIC	görbe alatti terület/MIC
ATCC	American Type Culture Collection
CAS	casprofungin
CBP	clinical breakpoint = klinikai határérték
CFU	colony forming unit = kolóniaképző egység
CDR1, CDR2	<i>Candida</i> Drug Resistance genes in <i>C. glabrata</i> = <i>Candida</i> gyógyszer rezisztens gének a <i>C. glabrata</i> -ban
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
C_{\max}	a szérumban mérhető maximális gyógyszerkoncentráció
C_{\max}/MIC	a szérumban maximális gyógyszerkoncentrációja/MIC
EC ₅₀	félhatásos koncentráció, az adott organizmus felét elpusztító koncentráció
EMA	European Medicines Agency = Európai Gyógyszerügynökség
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
FKS1, FKS2	a gombasejtfal szintéziséért felelős β -1,3-D-glükán-szintetáz enzimkomplex két alegysége
FLU	fluconazol
HS1	hot-spot 1 régió
HS2	hot-spot 2 régió
IDSA	Infectious Diseases Society of America

K_i	kinetikai gátlási konstans
K_m	Michaelis-Menten konstans
IC ₅₀	félhatásos gátló koncentráció
MDR1	multidrug transporter protein = multidrog transzporter fehérje
MIC	minimal inhibitory concentration = minimális gátló koncentráció
MIC _{24h}	24 óra után leolvasott MIC érték
MIC _{48h}	48 óra után leolvasott MIC érték
MIC ₅₀ és MIC ₉₀	az a gyógyszerkoncentráció, amely az izolátumok 50 illetve 90%-át gátolja
MICA	micafungin
MOPS	3-N-morfolino-propánszulfonsav
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PAFE	postantifungal effect = posztantifungális hatás
POSA	posaconazol
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium - sejtenyésztésre alkalmas táptalaj
VVC	vulvovaginális candidiasis

I. Bevezetés

Az életet veszélyeztető fertőzések 15%-ért a különböző gombafajok tehetőek felelőssé. Az egyes *Candida* speciesek a gombák okozta szisztémás infekciók 70-90%-át, míg az *Aspergillus* fajok a fertőzések 10-20%-át okozzák [Delaloye és mtsai. 2014].

Az elmúlt néhány évtizedben a nozokomiális gomba infekciók gyakorisága drámaian megnőtt. A növekedés oka elsősorban a tartós neutropénia (<500 neutrofil granulocita/ μ l), a különböző tumor típusok prevalenciájának a növekedése, a széles spektrumú antibiotikumok gyakori használata, az immunszuppresszív terápia, a sebészeti beavatkozások számának emelkedése, az égési sérülések, a hosszú kórházi tartózkodás (főleg intenzív osztályon), valamint a fejlett országok egyre inkább előregedő populációja. Ez a tendencia várhatóan tovább folytatódik majd az elkövetkezendő években is [Perlroth és mtsai. 2007; Pfaller és mtsai. 2012/a; Delaloye és mtsai. 2014].

Jelenleg több, mint 200 *Candida* fajt tartanak számon, melyek egy része az emberi normál flórában is jelen van (bőr, gasztrointesztinális rendszer, genitouretrális rendszer) [Warnock, 2007; Miceli és mtsai. 2011]. Ezek közül körülbelül 17 faj hozható összefüggésbe a különböző szisztémás *Candida* fertőzésekkel (Pfaller és mtsai. 2007).

A különböző *Candida* fajok a 4. leggyakoribb nozokomiális véráramfertőzést okozó mikróbák az Amerikai Egyesült Államokban (USA) a koaguláz negatív *Staphylococcus*-ok, a *Staphylococcus aureus*, valamint az *Enterococcus* fajok után [Wisplinghoff és mtsai. 2004]. Ezzel szemben Európában a 6-10. leggyakrabban izolált *genus*. Az összes véráramfertőzés csupán 2-3%-ért felelősek a különböző *Candida* fajok [Méan és mtsai. 2008].

A fertőzések növekvő tendenciáját jól szemlélteti, hogy az USA-ban az 1995 és 2002 közötti időszakban a *Candida* pozitív hemokultúrák aránya 8%-ról 12%-ra emelkedett [Wisplinghoff és mtsai. 2004].

Az invazív *Candida* fertőzések okozta mortalitás 30-60%, ami függ az adott *Candida* fajtól, a földrajzi elhelyezkedéstől, valamint az alapbetegségtől [Lass-Flörl 2009].

Az 1980-as években a *C. albicans* az össz-*Candida* fertőzések több mint 75%-ért volt felelős [Clark és mtsai. 2002; Richardson 2005]. Bár még mindig ez a faj a leggyakrabban izolálható *Candida* species (40-50%) a 90-es évektől a terápiás és profilaktikus fluconazol (FLU) használat következtében egyre gyakrabban diagnosztizálnak primer FLU rezisztenciával vagy csökkent FLU érzékenységgel rendelkező non-*albicans* fajokat (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. inconspicua*), különösen a hematológiai betegségekben szenvedőknél [Lass-Flörl 2009].

A szisztémás antifungális kemoterápia korszaka 1958-ban az amphotericin B-deoxikolat (AMB) bevezetésével kezdődött. Ez a polién típusú antimikotikum több, mint 40 évig „gold standardnak” számított az invazív gombás fertőzések kezelésében, azonban a terápia során fellépő súlyos mellékhatások (nephrotoxicitás) egyre inkább sürgették a kevesebb mellékhatással rendelkező új típusú antimikotikumok felfedezését [Dutcher 1968; Lewis 2011]. Az igazi áttörést 1990-ben a FLU bevezetése jelentette. Az AMB-től, valamint a korai imidazoloktól (miconazol, ketoconazol) eltérően a FLU nemcsak parenterálisan, hanem orálisan, sőt kenőcs formájában is alkalmazható szer, ezért mind a mukózális, mind a szisztémás gomba infekciókban is jól használható [Rex és mtsai. 1994].

A gombaellenes kemoterápia legújabb mérföldköve a gombák sejtfalszintézisét gátló echinocandinok bevezetése volt, melyek kedvező farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságaik miatt invazív candidiasisban és aspergillózisban egyaránt alkalmazható szerek [Denning 2003; Kofla és mtsai. 2011; Lewis 2011].

A caspofungin (CAS), mint az echinocandin család legrégebbi tagja 2001-ben került bevezetésre a terápiás gyakorlatba. A legtöbb *Candida* faj ellen fungicid hatást mutat, nem meglepő tehát, hogy a többi echinocandinnal egyetemben (micafungin (MICA), anidulafungin ANI)) jelenleg az elsőként választandó antifungális szer az invazív *Candida* infekciók empirikus kezelésére [Denning 2003; Kofla és mtsai. 2011]. Korábbi tanulmányok alapján a jelenleg alkalmazott normál napi dózis akár négyszerese sem okoz komolyabb mellékhatásokat. Ennek ellenére a klinikai vizsgálatok jelenleg még nem támasztják alá, hogy a terápiás kimenetel a nagyobb dózisú CAS esetén hatékonyabb lenne, mint a jelenleg elfogadott standard napi terápia [Betts és mtsai. 2009; Migoya és mtsai. 2011].

Az antifungális szerek farmakokinetikai/farmakodinámiai jellemzőinek pontos ismerete kulcsfontosságú az adekvát terápia kidolgozásához. Terápiás szempontból fontos fordulópontra volt a MIC érték (minimális gátló koncentráció) pontos meghatározására szolgáló standard mikrodilúciós módszer bevezetése az 1990-es években [Lewis 2007]. Az elmúlt két évtizedben publikált *in vitro*, *in vivo*, valamint a klinikai farmakodinámiával foglalkozó tanulmányok nagyban hozzájárulnak a *Candida* fajok által okozott véráramfertőzések sikeres terápiájához, továbbá segítik a MIC értékek interpretálására szolgáló érzékenységi breakpointok (CBP) meghatározását [Andes 2006].

A vizsgálatainkban is alkalmazott idő-ölés kísérletek fontos információkat szolgáltatnak az antifungális szer ölü aktivitását, valamint farmakodinámiai tulajdonságait (posztantifungális hatás, dózis-hatás) illetően. Ezek az adatok nagymértékben elősegítik a gomba, valamint a gyógyszer között fennálló dinamikus kapcsolat megértését [Klepser és mtsai. 1998].

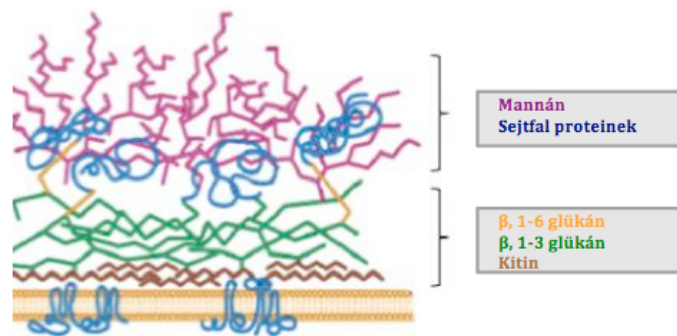
Kísérleteink során célunk volt, hogy az *in vitro* vizsgálatokból kapott eredményeket *in vivo* adatokkal kombinálva, illetve harmonizálva hatékonyabb CAS alapú terápiát lehessen kidolgozni nemcsak a *C. albicans*, hanem a ritkábban izolálható, de klinikailag releváns *C. krusei* és *C. inconspicua* fajokkal szemben.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. A *Candida* fajok általános jellemzése és virulenciája

A többi gombához hasonlóan a *Candida* fajok is valódi magmembránnal határolt sejtmaggal rendelkező eukarióta mikroorganizmusok [Mayer és mtsai. 2013].

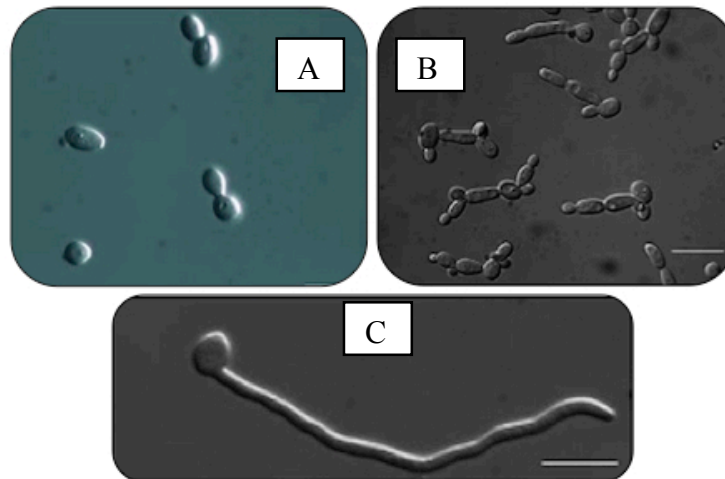
Az egyes *Candida* speciesek sejtfa 80-90%-ban tartalmaz szénhidrátot. A három legfontosabb sejtfa alkotó poliszacharid a β -glükánok, kitin és a mannán [Cassone 1989]. A β -glükán, mint fő szerkezeti komponens 47-60%-ban van jelen, míg a kitin jóval kisebb arányban (0,6-9%). Ezenkívül a sejtfa még 6-26%-ban tartalmaz fehérjét és 1-7%-ban különböző lipideket (1. ábra). Az emlős eukarióta sejtekkel összehasonlítva további különbség a sejtmembrán ergoszterin tartalma. Ezek a gombákra jellemző molekulák több antifungális szer potenciális támadáspontjai lehetnek. [Molano és mtsai. 1980; Chaffin és mtsai. 1998; Lewis 2011].



1. ábra A *Candida* sejtfa általános felépítése [Gow és mtsai. 2011].

Megjelenési formájukat tekintve az egyes *Candida* fajok három fő morfológiai típusban fordulhatnak elő: élesztő, pszeudohifa és hifa (2. ábra). Az élesztő forma mind bipoláris, mind tengelyirányú sarjadzásra képes, ovális, önálló sejt. A pszeudohifa képzés esetén az utódsejtek láncszerűen együtt maradnak, de azok élettanilag függetlenek egymástól. Ezzel szemben a hifa sejtjei közötti válaszfalakon (septum) általában pórus található, ami lehetővé teszi a szabad anyagáramlást a hifát felépítő sejtek között [Thompson és mtsai. 2011]. Egyes *Candida* fajok (*C. albicans*, *C. dubliniensis*) tápanyagszegény környezetben chlamydiospórát képezhetnek. A chlamydiospóra a hifák végén megjelenő kerek, vastag falú kitartóképlet [Staub és mtsai. 2007].

A *C. albicans*, *C. dubliniensis* és *C. tropicalis* esetén mindhárom morfológiai forma megtalálható (élesztő, pszeudohifa, hifa), míg a *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, valamint a *C. parapsilosis* esetében csak az élesztő és a hifa alak van jelen. [Moran és mtsai. 2002].



2. ábra A *Candida* fajok fő megjelenési formái (A: élesztő sejt; B: pszeudohifa; C: hifa) [Kabir és mtsai. 2012].

A különböző morfológiai változatok megjelenését befolyásolhatja a tápanyaghiány, illetve a hőmérsékletváltozás. *C. albicans* esetében 37°C-on a sarjadzó alak, míg 25°C-on a fonalas morfológia jellemző. Ez a jelenség a dimorfizmus, ami az egyik legfontosabb virulenciafaktor [Thompson és mtsai. 2011]. *C. albicans* esetében a pH is jelentősen befolyásolhatja a morfológiát (pH <6 élesztő forma, pH >7 hifa forma) [Mayer és mtsai. 2013].

A fertőzés folyamán az egyes *Candida* fajok a gazdaszervezet különböző nyálkahártya felszíneit élesztő formában kolonizálják. Szisztémás infekció során az egysejtű alak a vérkeringés segítségével könnyebben eléri a különböző célszerveket. Ezzel szemben a hifának a gazdaszervezet szöveti inváziójában, az endotél sejtek károsításában, valamint a makrofágok lízisében lesz központi szerepe [Odds 1994; Mitchell 1998; Brown 2002].

Az egyes *Candida* fajok a biotikus és abiotikus felszínhez leginkább a különböző adhezinekkel képesek hozzátapadni. A *C. albicans*-szal összehasonlítva a *C. krusei*-nek 15-ször kisebb a tapadási képessége a biológiai felületekhez és 5-ször nagyobb az akrilát tartalmú műanyag felszínhez [Samaranayake és mtsai. 1994].

Az egyik legjobban ismert adhezin csoport az ALS fehérje család (agglutinin-like sequence) [Verstrepen és mtsai. 2006; Murciano és mtsai. 2012]. Az ALS fehérjék glikozilfoszfatidilinozitol-kapcsolt sejt felszíni glikoproteinek. A hifák által expresszált ALS3 különösen fontos az adhézióban. Korábbi kísérletekben az ALS3 mutáns *C. albicans* kevésbé

tudott megtapadni *in vitro* az orális epítél sejteken [Wächtler és mtsai. 2012]. Egy másik fontos adhezín molekula a hifa-asszociált Hwp1 fehérje [Mayer és mtsai 2013].

Az ALS3 nemcsak adhezínként, hanem invazínként is funkcionál, csakúgy, mint az Ssa1, egy a Hsp70 családba tartozó protein [Phan és mtsai. 2007]. A *C. albicans*-szal összehasonlítva a *C. krusei* kevésbé invazív faj. Ezt bizonyítja egy korábbi tanulmány, amiben a *C. albicans* az epitélium minden rétegébe képes volt behatolni, míg a *C. krusei* a *stratum corneum*-ba sem volt képes penetrálni [Howlett 1975].

A *Candida* fajok talán legfontosabb virulenciafaktorai a különböző szekretált aszpartil proteinázok (SAP). Korábbi kutatások alapján ezek a hidrolitikus enzimek kulcsfontosságú szerepet játszanak az adhézióban és a szövetek inváziójában. Széles szubsztrátspecifitással rendelkeznek [Remold és mtsai. 1968]. Többek között képesek degradálni az albumint, a hemoglobint, a kollagént, valamint a legtöbb immunglobulint [Staib 1965]. A *C. albicans*-nál eddig 10 SAP gént írtak le. Érdekes módon a *C. krusei* és *C. kefyr* esetében eddig még nem azonosítottak ilyen típusú géneket [Parra-Ortega és mtsai. 2009]. Egy korábbi tanulmányban Sugita és munkatársai által vizsgált *C. inconspicua* törzseknél (38 db) szintén nem tapasztaltak aszpartil proteináz termelést [Sugita és mtsai. 2004]. A SAP1-SAP3 gének által kódolt fehérjék esszenciálisak a mukózális fertőzésekben, míg a SAP4-SAP6 géntermékek a szisztémás infekcióban játszanak kulcsfontosságú szerepet. A SAP9 és a SAP10 gének fehérjéi sejtfelszínhez kötötten helyezkednek el és a sejt integritását biztosítják [Sanglard és mtsai 1997; Silva és mtsai. 2014].

A sejtek belsejébe történő penetrációt a *Candida* sejtek által szekretált hidrolázok segítik elő. A három legfontosabb szekretált hidroláz enzimtípus a lipázok, foszfolipázok és a proteázok [Wächtler és mtsai. 2012]. Utóbbi két enzimescsoport a *C. krusei* izolátumokból hiányzik. Ez magyarázattal szolgálhat a *C. albicans*-nál alacsonyabb virulenciára [Samaranayake és mtsai. 1994].

További jelentős virulenciafaktor a katétereken, műbillentyűkön és a nyálkahártya felszíneken gombák által szekretált poliszacharid mátrix, a biofilm. Leggyakoribb biofilmképző gombák közé tartoznak a *C. tropicalis*, a *C. parapsilosis*, a *C. glabrata* és a *C. albicans*. A már előbbiekben leírt ALS3 és Hwp1 adhezín központi szerepet tölt be a biofilm kialakításában [Nobile és mtsai. 2008]. Az érett biofilm ellenáll számos antifungális szernek, valamint a gazdaszervezet immunsejtjeinek. A rezisztencia oka a sűrű biofilm mátrix, a különböző efflux pumpák (MDR1, CDR2) overexpressziója és a metabolikus plaszticitás [Fanning és mtsai. 2012].

II.2 A *Candida* fajok által okozott megbetegedések

A *Candida* fajok által okozott megbetegedéseket összefoglaló néven candidiasisnak nevezzük. Gyakorlati szempontból érdemes a *Candida* okozta fertőzéseket két csoportra osztani: mukózális és szisztémás candidiasis [Szalka és mtsai. 2005; López-Martinez 2010].

Az első csoportba olyan kórképek tartoznak, amelyek normál immunrendszerű egyéneknél is előfordulhatnak. Ilyenkor gyakran valamilyen átmeneti tényező borítja fel az egyensúlyt a normál flóra többi tagja és az adott *Candida* faj között. Ebbe a csoportba tartozik a soor vagy szájpenész, amelyet a születés után a bukkális nyálkahártyán megjelenő fehér felrakódás jellemez [Gergely 2003].

A vulvovaginális candidiasis (VVC) a fogamzóképes korú nők körülbelül 75%-át érinti életük során legalább egyszer. A VVC legfontosabb hajlamosító tényezője a hüvelyi pH emelkedése, amely felborítja a hüvely normál flóráját. Legfontosabb tünete a fehér, időnként darabos, sűrű, homogén folyás [Sobel 2007; López-Martinez 2010]. További enyhe lefolyású *Candida* okozta megbetegedés a paronychia, valamint a bőr felszíni candidiasisa [López-Martinez 2010].

A másik jóval súlyosabb csoportba a szisztémás vagy invazív *Candida* infekciók tartoznak. Az ilyen típusú fertőzések legfontosabb predisponáló tényezője a súlyos neutropénia és a különböző sebészeti beavatkozások. A szisztémás fertőzések általában vagy a gasztrointesztinális traktust eleve kolonizáló *Candida* törzsekből származnak vagy külső katéter használat eredményeképpen kerülnek a véráramba (candidaemia). Candidaemiát általában az esetek 50-70%-ban diagnosztizálnak [Sims és mtsai. 2005].

Akut disszeminált candidiasis esetén az egyes nem egymás mellett elhelyezkedő szervekben kialakuló *Candida* infekció valószínűsíthetően hematogén szóródás eredménye. A hematogén szóródás első klinikai manifesztációja lehet az endophtalmitis, amely maradandó vakáságot okozhat [Rodríguez-Adrian és mtsai. 2003; Sims és mtsai. 2005]. Az akut disszeminált candidiasis további formái közé tartozik a központi idegrendszer candidiasisa (meningitis), osteomyelitis, peritonitis és a pulmonáris candidiasis. A *Candida* okozta meningitis főleg iatrogén okokra vezethető vissza [Sims és mtsai. 2005].

Bár a kiválasztó szervrendszer fiziológiás körülmények között steril, az aszimptomatikus *Candida* kolonizáció gyakori. A primer húgyúti candidiasis a beültetett katéterekhez továbbá a cukorbetegséghez társuló nozokomiális infekció [Sobel és mtsai. 2000].

A krónikus disszeminált candidiasist korábban hepatosplenicus candidiasisnak is hívták. Elhúzódó, mély granulocytopenia esetén alakul ki [Rex és mtsai. 2000; Szalka és mtsai.

2005]. A legfontosabb tünetei az antibiotikum terápiára nem reagáló folyamatosan fennálló lázas állapot, valamint az emelkedett szérumszén-dioxid szint. A különböző képalkotó eljárásokkal többszörös léziók figyelhetők meg a májban, a vesében, ritkábban a tüdőben [Kontoyiannis és mtsai. 2000; van Burik és mtsai. 1998].

II.3 A *Candida* fajok epidemiológiája

Az USA-ban 1979 és 2000 között a különböző gombák okozta véráramfertőzések több mint a duplájára emelkedtek [Martin és mtsai. 2003]. Ugyanitt 1980-ban még 1557 volt a különböző gombás fertőzésekből eredeztethető halálozások száma, ez az érték 1997-ben már meghaladta a 6000-et. A különböző mikózisokkal összefüggő halálozásokért elsősorban a különböző *Candida*, *Aspergillus* és *Cryptococcus* fajok tehetőek felelőssé [McNeil és mtsai. 2001].

Jelenleg az invazív candidiasisokban több, mint 17 különböző *Candida* fajnak tulajdonítanak valamilyen etiológiai szerepet. Az 1997 és 2007 között elvégzett ARTEMIS felmérés alapján a különböző kórfolyamatokból származó *Candida* fertőzések több mint 90%-ért csupán öt faj tehető felelőssé (*C. albicans* (65,3%), *C. glabrata* (11,3%), *C. parapsilosis* (6%), *C. tropicalis* (7,2%), *C. krusei* (2,4%)) [Pfaller és mtsai. 2007; Pfaller és mtsai. 2008/b]. A felmérés során 41 ország 142 különböző orvosi intézményének 256.882 *Candida* izolátumát vizsgálták [Pfaller és mtsai. 2007; Pfaller és mtsai. 2010/b].

Fontos kiemelni, hogy az egyes *Candida* fajok eloszlása földrészenként, sőt földrészen belül régióként, valamint betegcsoportonként is különbözhet (3. ábra) [Pfaller és mtsai. 2010/b]. Az ARTEMIS felmérés során a földrészenkénti eloszlás tekintetében *C. albicans*-t a legnagyobb arányban Európában (67,9%), illetve Afrikában (67,1%) izoláltak. Észak-Amerika országaiban a *C. albicans* okozta fertőzések aránya „csupán” 48,9% (3. ábra) [Pfaller és mtsai. 2007; Pfaller és mtsai. 2010/b; Simon és mtsai. 2013].

Pfaller és munkatársai 2004 és 2008 között 3648 páciens bevonásával vizsgálták a különböző *Candida* fajok okozta véráramfertőzések kimenetelét. A felmérés során *C. albicans* volt a leggyakrabban izolálható faj az újszülött intenzív osztályokon (54,8%), ezzel szemben a hematopoetikus őssejt transzplantáltaknál az eseteknek csupán 17,6%-ért volt felelős [Pfaller és mtsai. 2012/a].

Az ARTEMIS program keretében 2001 és 2003 között 7318 törzset izoláltak Magyarországról, amelyeknek 68,8%-a bizonyult *C. albicans*-nak [Dóczi és mtsai. 2006].

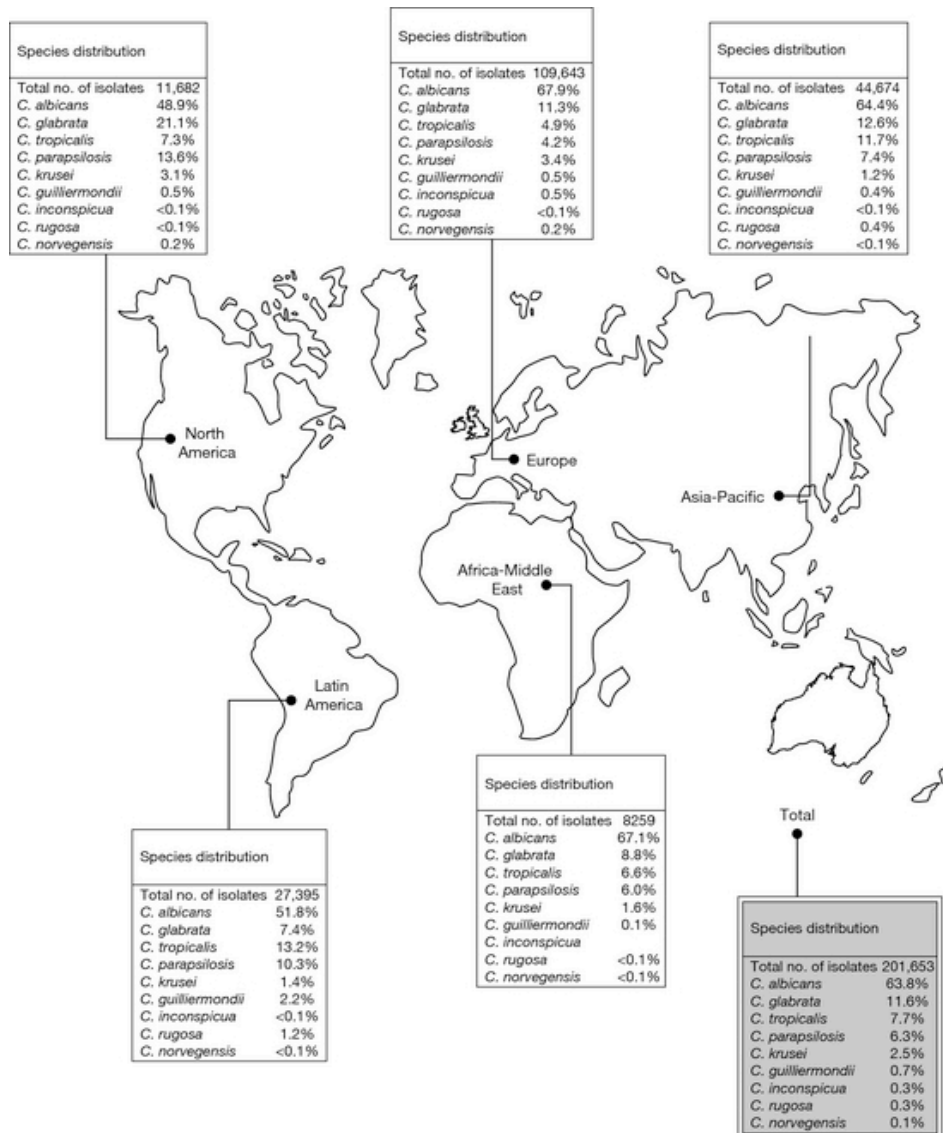
Annak ellenére, hogy még mindig a *C. albicans* a leggyakrabban izolálható *Candida* species az 1990-es évek elejétől a FLU használat miatt egyre gyakrabban izolálnak non-*albicans* *Candida* fajokat [Pfaller és mtsai. 2007].

1997 és 2003 között a *C. krusei* okozta infekciók aránya 1,7%-ról 2,7%-ra emelkedett [Pfaller és mtsai. 2007]. Pfaller és munkatársai 2004 és 2008 között 3648 betegből 113 esetben azonosítottak *C. krusei*-t. Az általunk is vizsgált *C. krusei* elsősorban a neutropeniás betegekben (51,3%), hematopoetikus őssejt transzplantáltakban (19,4%), valamint a

hematológiai betegségekben szenvedőknél (16%) gyakori. Fontos kiemelni, hogy az öt legfontosabb *Candida* faj közül a *C. krusei*-nek volt a legalacsonyabb a 90 napos túlélési aránya (53,5%) [Pfaller és mtsai. 2012/a]. A *C. krusei* Közép- és Kelet- Európában a szisztémás infekciók 3-5%-ért felelős [Pfaller és mtsai. 2010/b]. Egy Thaiföldön elvégzett epidemiológiai felmérés alapján a *C. krusei* a non-*albicans* fajok okozta fertőzések 25%-ért volt felelős [Apisarnthanarak és mtsai. 2009].

Pfaller és munkatársai 2001 és 2005 között az ARTEMIS programhoz kapcsolódó felmérésben 137.487 izolátumból 3448 izolátumot identifikáltak *C. krusei*-ként. Ebben az időintervallumban Magyarországról 12.665 mintát vizsgáltak, amiből 519 (4,1%) bizonyult *C. krusei*-nek. Ennél magasabb prevalenciát csak Szlovákiában (5,1%), Lengyelországban (6%) és Csehországban (7,6%) mértek [Pfaller és mtsai. 2008/a]. Majoros és munkatársai hasonló adatokat figyeltek meg a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumában 1997 és 2000 között elvégzett epidemiológiai felmérés eredményeként. Míg 1997-ben 2,7% volt a *C. krusei* okozta fertőzések aránya, ez a szám 2000-ben már 4,3% volt [Majoros és mtsai. 2002].

Jelenleg kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a *C. inconspicua* okozta fertőzésekről. Az első *C. inconspicua* által okozott klinikai megbetegedést Baily és munkatársai közölték, akik a FLU kezelést követően izoláltak *C. inconspicua* törzset AIDS-ben szenvedő betegek torok és nyelőcső váladékából [Baily és mtsai. 1997]. Az ARTEMIS program eredményei alapján *C. inconspicua* az esetek 0,3%-ban azonosítható, azonban a közép- és kelet- európai régióban az arány 0,5% [Pfaller és mtsai. 2010/b]. Egy 2006 és 2010 között elvégzett hat kórházat érintő francia tanulmány szerint a leggyakoribb hajlamosító tényező *C. inconspicua* okozta véráramfertőzésre a neutropénia, széles spektrumú antibiotikum használat, valamint a vaszkuláris katéterek alkalmazása. Fontos kiemelni, hogy a vizsgálati időszak alatt leggyakrabban az emésztő- és a légzőrendszerből (56,4%, illetve 26%) azonosítottak *C. inconspicua* törzseket [Guitard és mtsai. 2013].



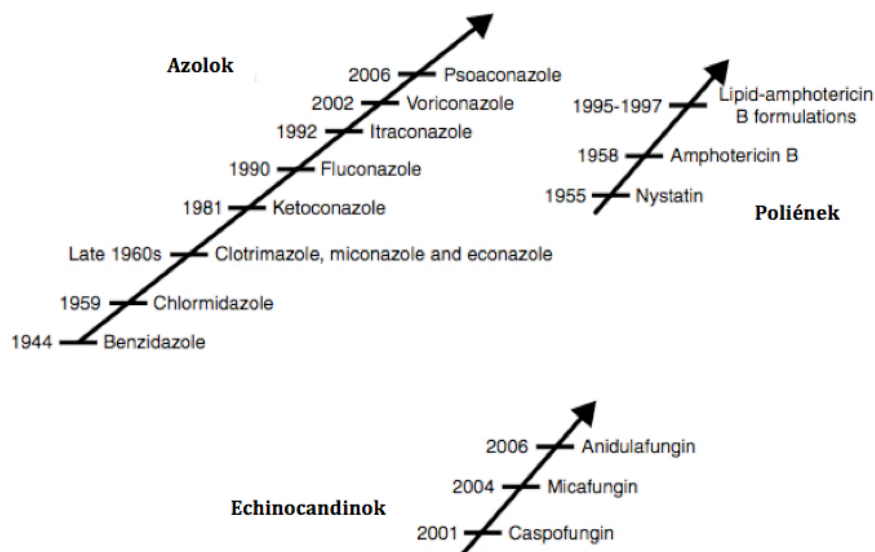
3. ábra A leggyakoribb *Candida* fajok földrészenkénti eloszlása. Az alábbi adatok a steril testtájról izolált *Candida* specierek mellett a nem steril testtájról izolált *Candida* fajok prevalenciáját is prezentálja [Simon és mtsai. 2013].

II.4. A szisztémás *Candida* infekciók kezelésére szolgáló antifungális szerek

A különböző epidemiológiai változásoknak köszönhetően az invazív gombás fertőzések kezelése egyre nagyobb kihívást jelentő feladat. Az adekvát terápia megválasztását tovább nehezíti a korai azonosításhoz szükséges könnyen elérhető vagy standardizált diagnosztikus eszközök hiánya. Az időben elkezdett kezelés talán az egyik legkritikusabb komponense a sikeres antifungális terápiának. Ezenkívül meg kell még említeni a terápiás gyógyszer-szint monitorozást, melynek alkalmazása egyes antimikotikumok esetében a megfelelő terápiás hatás elérése érdekében elengedhetetlen [Kontoyiannis 2012].

Továbbá még figyelembe kell venni, hogy minden egyes gyógyszer más-más aktivitással, hatékonysággal, farmakokinetikával/farmakodinámiával, mellékhatással, gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatással rendelkezik [Kontoyiannis 2012].

A szisztémás gombafertőzések monoterápiás kezelésében elsősorban a poliének, az azolok, valamint az echinocandinok a leggyakrabban használatos szerek. Ezen antimikotikumok klinikumba történő bevezetését a 4. ábra prezentálja [Andes és mtsai. 2013].

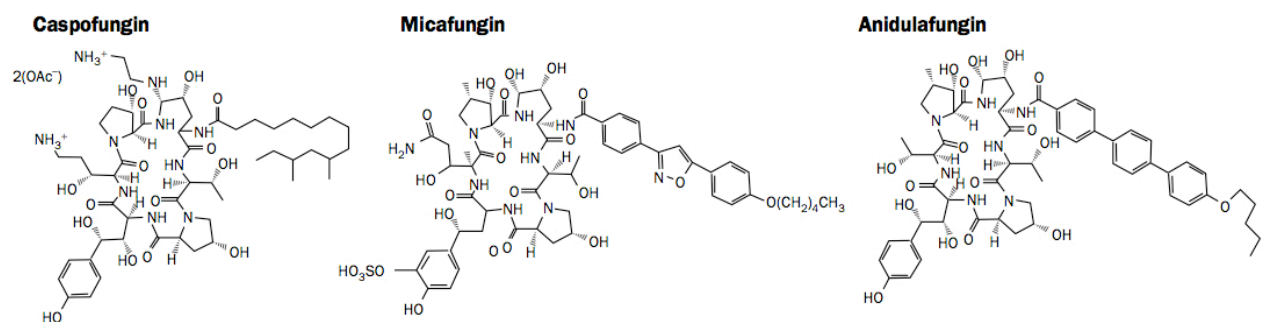


4. ábra Az antifungális szerek csoportosítása és bevezetésének időpontja (Food and Drug Administration, FDA) [Ghannoum és Perfect 2010]

II.4.1. Echinocandinok

Kémiaailag az echinocandinok ciklikus lipopeptid molekulák, melyek non-kompetitív módon gátolják a β -1,3-D-glükán-szintáz enzimkomplexet. Ennek következtében felborul a gomba sejtfa integritása, ami ozmolitikus instabilitáshoz, majd a sejt halálához vezet [Wiederhold és mtsai. 2003; Denning 2003; Kofla és mtsai. 2011; Mukherjee és mtsai. 2011]. A glükán-szintáz fehérje egy a gomba sejtfalában található, két alegységből (Fksp, Rho1p) álló enzimkomplex [Denning 2003]. A Rho1p a komplex regulatórikus alegysége, míg a három gén által kódolt (FKS1, FKS2, FKS3) Fksp katalizálja a cukor egységek szállítását az aktivált donor molekulákról (UDP-glükóz) az akceptor molekulákra [Kondoh és mtsai. 1997]. Érdekesség, hogy az FKS2 transzkripciója calcineurin függő, így calcineurin inhibitorokkal (tacrolimus) *in vitro* fokozható az echinocandinok aktivitása [Del Poeta és mtsai. 2000].

Jelenleg három echinocandin kapható a kereskedelmi forgalomban (5. ábra). A CAS a *Glarea lozoyensis* fermentlevéből izolált pneumocandin B módosított változata, melynek használatát 2001-ben hagyta jóvá az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) és az FDA. Az ANI, amely 2006 óta van forgalomban, az *Aspergillus nidulans* által termelt echinocandin B módosított formája. A MICA az USA-beli bevezetése után 4 évvel, 2008-ban hagyta jóvá az EMA. Ez a szer a *Coleophoma empedri* pneumocandin A0 molekulájának kémiaailag modifikált változata [Mukherjee és mtsai. 2011; Kofla és mtsai. 2011].



5. ábra Az echinocandinok szerkezeti képlete [Denning 2003].

Az echinocandinok a legtöbb *Candida* faj ellen fungicid még az *Aspergillus* speciesek ellen fungisztatikus hatást mutatnak. Ezenkívül aktívak még *Pneumocystis jirovecii* ellen. *Zygomycetes*, *C. neoformans*, valamint *Fusarium* fajok ellen hatástalanok a klinikailag releváns koncentrációkon. Az egyes *Candida* fajok echinocandinok iránti MIC értéke alapvetően alacsony (0,03-0,06 mg/L), azonban néhány faj esetében (*C. parapsilosis*, *C.*

guilliermondii) a MIC érték akár a százszorosa is lehet a *C. albicans* esetén tapasztalt alacsonyabb MIC értékeknek [Lewis és mtsai. 2011; Mukherjee és mtsai. 2011].

Az echinocandinok tipikusan koncentrációfüggő módon ható szerek [Wiederhold és mtsai. 2004]. Az ilyen típusú antifungális szerekre a C_{max}/MIC (C_{max} : a gyógyszer szérumban mérhető maximális koncentrációja/minimális gátlókoncentráció), valamint az AUC/MIC (AUC : a u n d e r u n d e r c u r v e, koncentráció-idő függvény alatti terület) farmakodinámiás paraméterek jellemzőek. Az AUC annál nagyobb, minél nagyobb koncentrációban és minél hosszabb ideig van jelen az adott farmakon a monitorozott kompartmentben. Az ilyen típusú farmakodinámiás paraméterek esetében felmerülhet, hogy a jobb klinikai kimenetel érdekében egyszeri nagy dózisokat alkalmazzunk a terápia során, a napi alacsonyabb koncentrációjú gyógyszeradagok helyett [Andes 2006].

Az echinocandinok további jellegzetessége az *in vitro* RPMI-1640-ben mért relatíve hosszú posztantifungális hatás (PAFE) [Garcia és mtsai. 2002]. Korábbi tanulmányokban a CAS által kifejtett RPMI-1640-ben mért PAFE >12 óra volt a MIC fölötti koncentrációkon [Ernst és mtsai. 2000]. Di Bonaventura és munkatársai a PAFE teljes hiányáról számoltak be CAS vizsgálata során *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, és *C. lusitaniae* izolátumok esetében [Di Bonaventura és mtsai. 2004]. A CAS-hoz hasonló eredmények figyelhetők meg MICA vizsgálatok is az egyes *Candida* speciesek ellen. Fleischhacker és munkatársai a vizsgált koncentrációkon 0,9 - >20 órás PAFE-ről számoltak be *C. albicans* és *C. dubliniensis* izolátumok esetén. Ebben a tanulmányban a 4 x MIC koncentrációkon mért PAFE értékek voltak a legmagasabbak [Fleischhacker és mtsai. 2008]. Az ANI használatok hasonlóan az előbbiekhöz, normál RPMI-1640 tápközegben a mért PAFE >12 óra volt *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. parapsilosis* izolátumok esetén [Nguyen és mtsai. 2009].

Érdemes megjegyezni, hogy az echinocandinok terápiájában jelenleg a napi alacsony egyszeri dózis az elfogadott kezelési stratégia. Az echinocandinok féléletideje 13 és 27 óra között változik. Ebből kifolyólag a jelenlegi dozírozási stratégiákat figyelembe véve a PAFE nem feltétlenül jelent terápiás előnyt. Viszont ha a jelenleg elfogadott tradicionális napi kis dózisok helyett, adott esetben heti egyszeri nagydózisokat alkalmaznánk ugyanolyan összdózisra vetítve a PAFE mértéke már terápiás előnyt jelenthet. Ennek az elméletnek az alátámasztására azonban további *in vivo*, valamint klinikai tanulmányok szükségesek [Pound és mtsai. 2010].

Egy további az echinocandinok által kiváltott jelenség a paradox hatás. A Stevens és munkatársai által leírt paradox növekedés egy kvadrifázikus folyamat, ahol a MIC érték alatti növekedést, majd a MIC érték fölötti gátlást bizonyos izolátumoknál magas MIC érték fölötti

koncentrációkon újbóli növekedés követi. A folyamat utolsó szakasza a legmagasabb koncentrációkon tapasztalható teljes növekedésgátlás [Stevens és mtsai. 2004]. Habár paradox hatást azonosítottak már CAS, MICA és ANI esetében is, a jelenség előfordulása függ az adott *Candida* fajtól, izolátumtól, kísérleti médiumtól, valamint az echinocandin fajtájától. A paradox hatás leggyakrabban a CAS használat során tapasztalható (*C. albicans* 60%, *C. parapsilosis* 90%, *C. tropicalis* 40%, *C. krusei* 10%). A jelenség kevésbé gyakori MICA (*C. tropicalis* 70%, *C. krusei* 60%) és ANI (*C. albicans* 40%, *C. tropicalis* 20%) használata során [Chamilos és mtsai. 2007]. A paradox növekedés hátterében a magas echinocandin koncentráció okozta stresszindukált kompenzatórikus kitinszintézis áll. A paradox növekedést mutató sejtek sejtfalában a glükán tartalom lecsökken a kitin tartalom pedig 4-8-szorosára növekszik [Stevens és mtsai. 2006, Bizerra és mtsai. 2011]. A paradox növekedés klinikai relevanciája megkérdőjelezhető, ugyanis Shields és munkatársai korábban már *C. albicans* esetében bebizonyították a paradox hatás megszűnését 50% humán szérum jelenlétében (Shields és mtsai. 2011).

Az intravaszkuláris katéterek használatához gyakran társulhat candidaemia, amit súlyosbíthat a katéteren kialakuló gomba eredetű biofilm. A FLU-lal ellentétben mindhárom echinocandin képes behatolni a biofilmbe, ezzel segítve a katéter-asszociált fertőzések kezelését [Kuhn és mtsai. 2004].

A jelenleg alkalmazott dozírozási stratégia CAS esetében egyszeri 70 mg-os telítő dózis utáni napi 50 mg fenntartó dózisokat ír elő, MICA használata során 100-150 mg/nap, ANI esetén 200 mg egyszeri telítő dózis után napi 100 mg az elfogadott terápia. [Pappas és mtsai. 2009].

Az érvényben lévő kezelési ajánlások mellett egyik echinocandin sem képes terápiás szintet elérni a szemben, valamint a központi idegrendszerben, így nem ajánlatosak gomba eredetű meningitis és endophtalmitis kezelésére [Gauthier és mtsai. 2005; Pappas és mtsai. 2009].

Az echinocandinok nem befolyásolják a citokróm P450 enzimrendszer és a P-glikoprotein család fehérjéinek működését. Ennek következtében relatíve kevés echinocandinokhoz kapcsolódó gyógyszer-gyógyszer interakciót ismerünk [Lipp 2008; Kofla és mtsai. 2011].

II.4.1.1. Caspofungin

A telítő dózis alkalmazásával a CAS már a beadást követő első napon eléri a vérben az 1 mg/L-es célkoncentrációt és a napi 50 mg-os fenntartó kezelés időtartama alatt nem is csökken ez alá. Ez az a koncentráció, ami a klinikailag releváns *Candida* fajokhoz tartozó izolátumok legalább 90%-át gátolja [Bartizal és mtsai. 1997; Stone és mtsai. 2002]. A jelenlegi terápiás stratégia, ami egyszeri 70 mg-os telítő dózis utáni napi 50 mg-os fenntartó dózisokat ír elő, 97,6-100,5 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ -es AUC érték érhető el.

Az egyszeri dózis beadását követően a gyógyszer plazmakoncentrációja polifázikus csökkenést mutat. Közvetlenül az infúziót követően van egy rövid disztribúciós fázis, majd ezután egy dóziszfüggő 6-48 óráig tartó β -fázis. A magasabb dózisoknál egy 2-3 napig tartó γ -fázis is megfigyelhető. A plazmából történő clearance relatíve lassú 9,85-12,43 mL/perc.

A többszöri dózis eliminációja is polifázikusan történik. Az infúzió után egy rövid eloszlási fázist tapasztalhatunk, majd egy domináns β -fázis, végül 48-72 óra után egy hosszú γ -fázis következik [Stone és mtsai. 2002].

Stone és munkatársai 14 napig tanulmányozták különböző többszörös dózisok (15 mg-70 mg) farmakokinetikai viselkedését egészséges férfiakban. A kísérlet során a CAS dóziszfüggő akkumulációját figyelték meg. A 15 mg/nap CAS dózis első nap mért AUC_{0-24} értéke 19,66 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ volt, a 14. napra 24,37 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ -re nőtt. Még látványosabb az emelkedés 70 mg napi CAS dózisoknál. Ebben az esetben az első nap 93,46 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ AUC_{0-24} értéket mértek, míg a 14. napon már 129,61 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ volt ez az érték. Az akkumuláció tényét támasztja alá a beadást követően 24 órával később mért szérum CAS koncentráció ($C_{24\text{h}}$) is. 15 mg-os napi dózisoknál az első nap 0,29 mg/L volt a $C_{24\text{h}}$ szérumkoncentráció. A 14. napra 0,38 mg/L-re nőtt. Hasonlóan az AUC_{0-24} értékekhez a nagyobb koncentrációkon még látványosabb a növekedés. Magasabb CAS dózis esetén (70 mg/nap), míg az első napon mért $C_{24\text{h}}$ 1,30 mg/L volt, addig a 14. napon ez az érték 2,37 mg/L-re nőtt [Stone és mtsai. 2002].

Louie és munkatársai a CAS terminális féléletidejét vizsgálták egér modellben. Abban az esetben, ha csak a szérumban lévő gyógyszer mennyiség időbeli változását követték a féléletidő 20,2 óra volt. Viszont amikor együtt modellezték a szérumban és vesében lévő CAS féléletidejét, az érték 59,2 órára változott. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a szövetek CAS rezervoárként szolgálhatnak és a bennük lévő gyógyszer mennyiség bizonyos idő után visszaáramlik a szérumba [Louie és mtsai. 2005].

Migoya és munkatársai az egyszeri nagydózisú CAS (150 mg, 210 mg) biztonságosságát és farmakokinetikáját hasonlították össze 21 napig adagolt 100 mg/nap CAS adagokkal

egészséges önkéntesekben. Az egyszeri 150 és 210 mg-os dózisok beadása után mért AUC értékek 279,7 és 374,9 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ voltak. A dózist beadását követő 24 órával a szérumban mért koncentráció 2,8 és 4,2 mg/L volt. Ugyanakkor a 100 mg/nap CAS dozírozási stratégia 227,4 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ AUC értéket eredményezett. A legalacsonyabb CAS szint a szérumban 4,7 mg/L volt [Migoya és mtsai. 2011].

Betts és munkatársai invazív candidiasisban szenvedő betegekben összehasonlították a 150 mg/nap CAS dozírozási stratégiát a jelenleg érvényben lévő terápiás ajánlással. A vizsgálat eredménye alapján mindkét kezelési típus egyaránt biztonságos és jól tolerálható volt, azonban a hagyományosan alkalmazott dozírozási stratégiával összehasonlítva a 150 mg/nap CAS adagolás statisztikailag nem jelentett terápiás előnyt [Betts és mtsai. 2009].

II.4.1.2. Echinocandin rezisztencia

Az echinocandinok gátolják az β -1,3-D-glükán-szintáz enzimkomplexet, amely a β -1,3-D-glükán sejtfaalkomponens bioszintézisét katalizálja. Az echinocandin rezisztencia leggyakoribb oka az Fksp alegységben bekövetkező intrinszik mutáció, szerzett mutáció, valamint az adaptív stressz válasz [Garcia-Effron és mtsai. 2011; Beyda és mtsai 2012].

Természetes módon bekövetkező FKS1 mutáció következtében a *C. parapsilosis* és *C. guilliermondii* izolátumok intrinszik, csökkent érzékenységgel rendelkeznek a különböző echinocandinok iránt. Ezen fajokhoz tartozó törzsek MIC értéke rendszerint 4-100-szor magasabb (0,5-8 mg/L), mint a *C. albicans* esetében megfigyelt értékek. A csökkent érzékenységhöz társuló klinikai szignifikancia kérdéses, mivel a *C. parapsilosis* és *C. guilliermondii* fajok által okozott infekciók ellen általában hatékonyak a jelenleg alkalmazott echinocandin terápiaik, bár nem az elsőként választandó szerek ezen fajok okozta fungaemiában. A klinikai hatékonyság részben az alacsony virulenciából adódik [Perlin 2007; Garcia-Effron és mtsai. 2008; Pappas és mtsai. 2009].

Korábban már megállapítást nyert, hogy a csökkent echinocandin érzékenység vagy rezisztencia kapcsolatba hozható az FKS1 gén mutációjával, ami aminosav szubsztitúcióhoz vezet az Fks1p alegység két úgynevezett „hot-spot” (HS) régiójában. A *C. parapsilosis* izolátumok esetén az Fks1p fehérje 660. pozíciójában bekövetkező prolin-alanin természetes aminosav csere a csökkent érzékenység oka. Hasonló jelenség figyelhető meg a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* esetében. *C. guilliermondii*-nál a 642. helyen elhelyezkedő metionin leucinra történő cseréje okolható a csökkent érzékenységgért [Perlin 2007; Garcia-Effron és mtsai. 2008; Chen és mtsai. 2011; Beyda és mtsai. 2012]. Ezigdig nem találtak olyan klinikai *C. parapsilosis* vagy *C. guilliermondii* izolátumot, amely a természetesen előforduló aminosav polimorfizmus mellett valamilyen szerzett mutációt tartalmazott volna az FKS1 fehérje „hot-spot” régiójában [Pfaller és mtsai. 2010/a].

Ez a típusú rezisztenciamechanizmus megtalálható még egyes *C. albicans* izolátumokban, valamint több non-*albicans* faj esetén is (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*). A *C. glabrata* esetében az FKS1 gén mutációján kívül az FKS2 génben bekövetkező módosulás is szerepet játszik a rezisztencia kialakulásában [Park és mtsai. 2005].

A rezisztens *C. albicans* törzseknél ezek az aminosav változások a 641-649. (hot-spot 1, HS1) vagy az 1345-1356. (hot-spot 2, HS2) aminosav pozícióban detektálhatók. Az aminosav csere leggyakrabban a HS1-gyen belül a 645-ös pozícióban lévő szerinnél következik be (S645): S645P (prolin), S645F (fenilalanin), S645Y (tirozin). Ezek a mutációk okozzák a

legnagyobb MIC érték növekedést (MIC >2 mg/L). Ezzel szemben ha a mutáció a HS1 régió N- és C-terminális végeinél következik be általában megmarad az enzim érzékenysége mindhárom echinocandin iránt (Park és mtsai. 2005; Garcia-Effron és mtsai. 2009/a).

A glükán-szintáz enzimben bekövetkező aminosav szubsztitúciók a CAS esetében 4-30-szoros, míg a MICA és ANI vizsgálata során 90-110-szeres MIC érték emelkedést eredményeztek [Garcia-Effron és mtsai. 2009/b].

Az FKS génekben bekövetkező mutációk jelentősen megváltoztatják a glükán-szintáz enzimkinetikai jellemzőit. A vad típusú izolátumokkal összehasonlítva szignifikánsan megnő a mutáns enzim IC₅₀ (félhatásos gátló koncentráció) (>1000x), valamint K_i (kinetikai gátlási konstans) (>100x) értéke. Az Fks1p-ben bekövetkező aminosav változás nem változtatja meg az enzim K_m (Michaelis-Menten konstans) értékét, azonban néhány mutáció csökkentheti a fehérje katalitikus sebességét (V_{max}) [Garcia-Effron és mtsai. 2008; Pfaller 2012/b].

FKS1 homozigóta mutáns *C. albicans* törzsek vizsgálata során az enzimkomplex katalitikus sebessége 10-65%-kal csökkent. Az enzimkinetikai változások mellett a sejtfal összetétele is megváltozhat, a kitin tartalom akár 9-65%-kal is növekedhet [Garcia-Effron és mtsai. 2009/b; Ben-Ami és mtsai. 2011].

Több jelentős tanulmány eredményei alapján az echinocandin rezisztencia relatíve ritka a *Candida* fajok körében (2,9-3,1%) [Castanheira és mtsai. 2010; Arendrup és mtsai. 2011]. Lortholary és munkatársai vizsgálták az antifungális kezelés candidaemiára kifejtett hatását. Eredményeik alapján a páciensek 4,7-szer gyakrabban fertőződtek csökkent CAS érzékenységgel rendelkező izolátumokkal, ha az infekciót megelőző 30 napban valamilyen CAS kezelést kaptak [Lortholary és mtsai. 2011].

Korábban publikált eredmények alapján az FKS mutációval rendelkező *Candida* törzsek virulenciája és életképessége általában alacsonyabb, mint a vad típusú izolátumoké (A vad típusú organizmusok nem rendelkeznek az adott antifungális szerrel szembeni szerzett rezisztencia mechanizmussal), így klinikai és epidemiológiai hatásuk korlátozott [Turnidge és mtsai. 2006; Ben-Ami és mtsai. 2011]. Kurtz és munkatársai tanulmánya alapján a mutáns *C. albicans* izolátumok képtelenek voltak normál hifa képzésre, ami alacsonyabb *in vitro* és *in vivo* virulenciához vezetett [Kurtz és mtsai. 1996].

Ben-Ami és munkatársai BALB/c egérmodellben vizsgálta az FKS1 mutáns *C. albicans* törzsek virulenciáját. A vad típusú törzsszel fertőzött egerek átlagos 30 napos túlélési aránya 13,3% volt, ugyanez az érték a mutáns törzsekkel fertőzött egerek esetén 60-100%. Ezenkívül a vesékből is 3-4 nagyságrenddel kevesebb gomba tenyésztett ki, mint a vad típusú *C. albicans*-szal fertőzött egerekből [Ben-Ami és mtsai. 2011].

A dózis növelés az echinocandinok farmakodinámiás jellemzői miatt (koncentrációfüggő hatás) hatékony lehet a rezisztens izolátumok okozta fertőzések terápiájában. A témában publikált eredmények egyelőre ellentmondásosak. Korábban Wiederhold és munkatársai mutáns *C. albicans* izolátumokkal (S645P, F641S) fertőzött immunkompetens rágcsáló modellt használva vizsgálták a nagy dózisú CAS (5-10 mg/kg/nap) *in vivo* hatékonyságát, ahol egyik használt dózis esetén sem tapasztaltak szignifikáns csíraszám csökkenést a kontroll csoporttal összehasonlítva [Wiederhold és mtsai 2011]. Egy másik kísérletben csökkent CAS érzékenységgel rendelkező *C. glabrata* izolátumokat vizsgáltak neutropéniás egérmodellben 0,5; 1; 5; 10 mg/kg/nap CAS dózisokat alkalmazva. A két nagy dózis (5-10 mg/kg/nap) szignifikánsan csökkentette a veséből kinőtt csíraszámot [Wiederhold és mtsai. 2007].

Bár az echinocandin rezisztencia miatti terápiás sikertelenség ritka, az egyre növekvő betegpopuláció, valamint az echinocandinok egyre inkább terjedő használata valószínűleg növelni fogja a rezisztencia gyakoriságát a jövőben.

II.4.1.3. Fajspecifikus echinocandin breakpoint-ok alkalmazása

Manapság két fő referencia módszer létezik az egyes *Candida* és *Aspergillus* fajok MIC értékének mikrodilúciós módszerrel történő meghatározására. Az egyik 1997-ben, az USA-ban kifejlesztett CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (2005-ig NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards) módszer, a másik az EUCAST metódusa (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), ami gyakorlatilag a CLSI egy módosított változata [Pfaller és mtsai 2011/a].

2007-ben az egyre gyarapodó klinikai és mikrobiológiai adatok miatt a CLSI indítványozta echinocandin breakpoint (CBP) (határérték) bevezetését. A CBP az a MIC érték ami alapján a terápiás sikert vagy sikertelenséget megjósolhatjuk. Ez az echinocandin CBP, melyet a későbbiekben bevezettek a különböző CLSI dokumentumokba is (M27-A3; M27-S3) „érzékenynek” minősítette a ≤ 2 mg/L MIC értékkel rendelkező *Candida* izolátumokat. A > 2 mg/L MIC értékkel rendelkező törzseket „nem érzékenynek” sorolta be, mivel ebben az időszakban még nem azonosítottak rezisztens izolátumokat. Ez a dokumentum az echinocandin rezisztenciáról még nem nyilatkozott [Pfaller és mtsai. 2008/c; CLSI 2008/a,b].

A CBP bevezetését követő években bebizonyosodott, hogy az echinocandin terápia során több faj esetében is terápiás sikertelenség jöhet létre. Ráadásul ezen rezisztens izolátumok vizsgálata során az RPMI-1640-ben mért MIC értékek nem feltétlenül érték el a 2 mg/L-es CBP-t [Pfaller és mtsai. 2010/a; Pfaller és mtsai. 2011].

A fajspecifikus határértékek bevezetése a *Candida* fajok esetében a baktériumoknál már létező CBP-k figyelembe vételével történt.

Az echinocandinok iránti fajspecifikus határérték meghatározásához segítséget nyújtott, hogy a neutropeniás egérmodellben elérhető fungisztikus hatáshoz mindhárom echinocandin esetében a *C. albicans* ellen volt szükség a legnagyobb dózisú echinocandinra, míg a kisebb virulenciával rendelkező *C. glabrata* és *C. parapsilosis* izolátumok szignifikánsan alacsonyabb echinocandin dózissal is gátolhatók voltak [Andes és mtsai. 2010]. A fajspecifikus CBP-k a legalacsonyabbak a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és a *C. krusei* ellen, míg jóval magasabbak *C. parapsilosis sensu stricto* és *C. guilliermondii* esetén.

A fajspecifikus határértékek a három echinocandinra vonatkoztatva az 1. táblázatban láthatóak. Fontos, hogy ezek a CBP-k jól használhatóak a terápia során kialakuló rezisztencia detektálására is [Pfaller és mtsai. 2011; Lockhart és mtsai. 2012; Wisplinghoff és mtsai. 2014].

Antifungális szer	Candida faj	Clinical breakpoint (mg/L)		
		Érzékeny	Mérsékelten érzékeny	Rezisztens
Anidulafungin	<i>C. albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0,12	0,25	≥0,5
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	≥8
Caspofungin	<i>C. albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0,12	0,25	≥0,5
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	≥8
Micafungin	<i>C. albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0,06	0,12	≥0,25
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	≥8

1. táblázat CLSI mikrodilúciós módszerrel meghatározott echinocandin fajspecifikus érzékenységi határértékek [Pfaller és mtsai. 2011].

II.4.1.4. A szérumban echinocandin farmakodinámiára kifejtett hatása

Korábban publikált *in vitro*, illetve *in vivo* adatok alapján az echinocandinok nagymértékben képesek kötődni a különböző szérumbanfehérjékhez, aminek következtében antifungális hatásuk jelentősen lecsökken. A gyógyszer kötődése CAS esetén elsősorban albuminhoz történik, aminek a mértéke 96,5%, MICA-nál 99,8% (albumin, alfa-1-savi glikoprotein), ANI esetében pedig kb. 99% [Stone és mtsai. 2004; Paderu és mtsai. 2007; Ishikawa és mtsai. 2009; Garcia-Effron és mtsai. 2011].

A „szabad gyógyszer hipotézis” értelmében csak a szabad gyógyszer-molekulák rendelkeznek farmakológiai aktivitással, bár ezen a területen még sok az ellentmondás [Odabasi és mtsai. 2007]. Ha a „szabad gyógyszer hipotézis” igaz lenne, a beadott MICA-nak csupán a 0,2%-a lenne farmakológiailag aktív, ami 500x-os MIC érték emelkedést eredményezne. Ezzel szemben több tanulmány is csupán 4-267x-es MIC növekedésről számolt be, amely alapján a MICA nem követi a „szabad gyógyszer elméletet” [Tawara és mtsai. 2000; Odabasi és mtsai. 2007; Paderu és mtsai. 2007]. Ishikawa és munkatársai eredményei alapján valóban megfigyelhető a MICA szérumbanfehérje kötődése és ezzel egyidejűleg az antifungális aktivitásának a csökkenése, azonban mivel az általuk kapott adatok nincsenek összhangban a „szabad gyógyszer hipotézissel” ez a kötődés valószínűleg reverzibilis és gyenge [Ishikawa és mtsai. 2009]. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy bár feltételezhetően az albumin a fő gyógyszer kötő molekula, a szérumban más fehérjéi (alfa-globulin, gamma-globulin) is hatással lehetnek a MICA, szérumbanfehérjék, valamint a patogén mikroba kölcsönhatására [Schäfer-Korting és mtsai. 1995].

Abe és munkatársai analbuminémiás patkánymodellben vizsgálták a MICA farmakodinámiás tulajdonságait. Kísérletükben az albumin nem játszott központi szerepet a gyógyszer *in vivo* farmakodinámiájában. Ebből következik, hogy az albuminon kívül más szérumbankomponensekhez is történhet a kötődés, amelyek az albumin hiányában jóval jelentősebb szerepet játszhatnak a MICA hatáscsökkenésében [Abe és mtsai. 2008].

Egy másik elmélet szerint ha MICA-ra érzékeny gombák vannak a közegben, a szérumbanfehérjékkel egyensúlyban lévő gyógyszer-molekulák könnyen felszabadulhatnak a fehérjekötött formából és a mikróbához kötődve kifejtetik antifungális hatásukat [Odabasi és mtsai. 2007; Paderu és mtsai. 2007].

Paderu és munkatársai a CAS, MICA és ANI hatását vizsgálták klinikai *Candida* izolátumok ellen 50% humán szérumban jelenlétében. CAS esetében a szérumban tápközegben mért MIC

érték 1-16x magasabb volt, mint a normál RPMI-1640-ben mért értékek. MICA-nál ugyanez az arány 32-128x-os, míg ANI-nál 8-256x-os volt [Paderu és mtsai. 2007].

Odabasi és munkatársai hasonló arányú MIC érték emelkedésről számoltak be 50% humán szérummal kiegészített tápközegben. Ebben az esetben is a CAS vizsgálata során tapasztalták a legcsekélyebb mértékű MIC emelkedést (1-16x), azonban a MIC értékek növekedése nem volt összhangban a fehérjekötődés mértékével [Odabasi és mtsai. 2006].

A MICA és ANI esetén tapasztalható nagyobb MIC érték változás valószínű, hogy valamilyen másodlagos faktornak köszönhető. Egy ilyen faktor lehet a gyógyszer eltérő módon történő transzportja a sejtekbe. Ezt az elméletet támogatja, hogy mindhárom echinocandin ugyanolyan mértékben gátolja a glükán-szintáz enzimet [Paderu és mtsai. 2007].

A CAS EC₅₀ (EC₅₀: az adott organizmus felét elpusztító koncentráció) értékének változását 0, 10, 20, 50%-os humán szérum jelenlétében vizsgálták. Míg normál RPMI-1640-ben CAS esetén az EC₅₀ érték 0,3-0,9 ng/mL volt, addig 50% humán szérum jelenlétében 10,8-18 ng/mL-re nőtt [Paderu és mtsai. 2007].

Wiederhold és munkatársai az ANI és a CAS *in vitro* és *in vivo* aktivitását vizsgálták *C. glabrata* izolátumok ellen. Kísérleteikben 5% és 50% humán, valamint egér szérum jelenlétében nézték a gyógyszerek hatékonyságát. Szérummentes tápközegben az ANI nagyobb *in vitro* hatékonysággal rendelkezett a CAS-nal összehasonlítva. Szérum jelenlétében viszont az ANI *in vitro* hatékonysága jóval nagyobb mértékben csökkent, mint a CAS-nál mért értékek, mind a humán, mind az egér szérum esetében. Sőt az 5% humán szérum kis mértékben fokozta is a CAS aktivitását [Wiederhold és mtsai. 2007].

A szérummal elvégzett *in vitro* kísérletekben kapott eredményeket igyekeztek *in vivo* is tesztelni, illetve megerősíteni. Neutropéniás egérmódelben a 0,5 mg/kg/nap, valamint az 1 mg/kg napi dózisok esetén a CAS szignifikánsan hatékonyabb volt (P<0,001), mint az ANI. A magasabb dózisok (5 mg/kg/nap, 10 mg/kg/nap) esetén a hatékonyságban azonban már nem volt szignifikáns eltérés [Wiederhold és mtsai. 2007].

III. Célkitűzések

Kísérleteink során a caspofungin *in vitro*, valamint *in vivo* hatékonyságát vizsgáltuk három klinikailag releváns *Candida* faj esetében (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. inconspicua*). A caspofungin farmakodinámiájának pontosabb megértése hozzájárulhat ahhoz, hogy a jövőben hatékonyabb caspofungin, illetve echinocandin alapú terápiát lehessen alkalmazni ezen *Candida* fajok ellen, javítva ezzel a betegek életkilátásait.

Vizsgálatainkban célunk volt:

- a caspofungin hatékonyságának *in vitro* vizsgálata *C. albicans*, *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok ellen idő-ölés kísérletek segítségével normál RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben
- a caspofungin posztantifungális hatásának vizsgálata *C. albicans* izolátumok ellen normál RPMI-1640-ben és 50% humán szérum jelenlétében
- a caspofungin által kifejtett ölési ráta meghatározása az idő-ölés kísérletek során nyert adatok segítségével *C. albicans*, *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok ellen
- az ölési ráta ismeretében az 50; 90; 99; 99,9%-os CFU csökkenéshez szükséges idő kiszámítása a *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok esetében
- a caspofungin *in vivo* hatékonyságának vizsgálata 1, 2, 3, 5 és 15 mg/kg napi gyógyszerdózisokat alkalmazva *C. krusei*-vel és *C. inconspicua*-val fertőzött neutropéniás egérmodellben

IV. Anyagok és módszerek

IV.1. A vizsgált izolátumok

A CAS *in vitro* hatékonyságának a vizsgálatához 3 *Candida* faj (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. inconspicua*) 10 klinikai izolátumát, 2 ATCC tesztörzset (American Type Culture Collection), valamint *C. albicans* és *C. krusei* esetében egy-egy echinocandin rezisztens izolátumot használtunk (DPL20, DPL45). Az összes vizsgált *C. albicans* (183, 3666, 10920, 12132), *C. krusei* (4363, 5029, 27393) és háromból egy *C. inconspicua* klinikai törzs (20114) vérből származott. A *C. inconspicua* 22027 izolálása peritoneális mintából történt, míg a 12060-as *C. inconspicua* izolátum sebből lett azonosítva. A két echinocandin rezisztens izolátum (DPL45, FKS F645F/C; DPL20, FKS F645P) David S. Perlin laboratóriumából származott (Public Health Research Institute, New Jersey Medical School-Rutgers, Newark, New Jersey, USA).

A *C. albicans* és *C. krusei* izolátumok azonosításához APID32C panel és MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight) tömegspektrométert használtunk, míg a *C. inconspicua* törzsek identifikálása korábban már molekuláris biológiai módszerekkel megtörtént [Majoros és mtsai. 2003].

IV.2. A caspofungin minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása

A CAS iránti MIC értékek meghatározása standard makrodilúciós módszerrel történt a CLSI által elfogadott M27-A3-as dokumentum alapján normál RPMI-1640-ben (pH 7, MOPS pufferrel kiegészített), valamint 50% humán szérummal (AB vércsoportú humán férfi, Sigma, Budapest, Magyarország) kiegészített tápközegben, legalább két alkalommal [CLSI, 2008/a,b; Földi és mtsai. 2012/b].

A MIC meghatározást 0,015-32 mg/L tartományban végeztük. Az egyes izolátumok MIC értékét 24 óra után olvastuk le. MIC értéknek azt a koncentrációt tekintettük, ahol legalább 50%-os növekedés csökkenés volt megfigyelhető a gyógyszermentes kontrollhoz képest [CLSI, 2008/a,b].

IV.3. Idő-ölés (time-kill) görbék felvétele

Az idő-ölés kísérletek során a Klepser és munkatársai által leírt módszert követve a CAS *in vitro* aktivitását vizsgáltuk normál RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben. A legalacsonyabb vizsgált koncentráció minden izolátum esetén 0,5 x MIC érték, míg a legmagasabb vizsgált koncentráció 32 mg/L volt. Előkísérleteink alapján a szérumban tapasztalt magasabb MIC értékek miatt mindhárom faj (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. inconspicua*) esetén csak azokat az adatokat ábrázoltuk, ahol a CAS-nak mindkét tápközegben mérhető aktivitása volt. Ezek az értékek a *C. albicans* esetében 0,25; 1; 4; 8; 16 és 32 mg/L, míg a *C. krusei* és *C. inconspicua* esetén 1, 2, 4, 8, 16 és 32 mg/L CAS koncentrációk voltak, koncentrációnként 10 mL-es végtérfogatban (1. kép) [Klepser és mtsai. 1998].

A vizsgálatok során MIC értéktől függetlenül 32 mg/L volt a legnagyobb vizsgált CAS koncentráció, mivel klinikai tanulmányokból tudjuk, hogy a napi nagydózisú CAS (150-200 mg) használata 30,4-40,6 mg/L-es szérum csúcskoncentrációt eredményez emberben [Cornely és mtsai. 2011].

A kísérlet során Sabouraud dextróz agaron (SDA) tenyésztett gomba sejtekből 0,5 McFarland (McF) sűrűségű gombaszuszpenziót készítettünk. Ez az érték gombasejtek esetén $\sim 10^5$ CFU (Colony Forming Unit) sejtet jelent milliliterenként.

A vizsgálat folyamán a *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok esetében 0, 4, 8, 12, 24 és 48 óra elteltével a különböző gyógyszerkoncentrációkat tartalmazó csövekből mintát vettünk (100 μ l) (2. kép), majd az egyes mintákból tízes alapú tova futó hígítási sorozatot készítettünk (3. kép). Ezt követően az egyes hígításokat tartalmazó csövekből 4x30 μ L-t oltottunk ki SDA táptalajra (4. kép). A táptalajokat 48 óráig 35°C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő után a kinőtt telepeket megszámláltuk (5. kép), majd a kapott értékeket (CFU/mL) ábrázoltuk az idő függvényében. A *C. albicans* törzsek esetében 24 óráig vizsgáltuk a gombasejtszám változást [Klepser és mtsai. 1998; Cantón és mtsai. 2009; Cantón és mtsai. 2010; Földi és mtsai. 2012/b].

Minden izolátum, illetve médium esetén legalább két párhuzamos vizsgálatot végeztünk. Az idő-ölés görbéket GraphPad Prism 4.03 Windows szoftver segítségével ábrázoltuk.

IV.4. A posztantifungális hatás vizsgálata

Előkísérleteinkben az 5, 10, 30 perces CAS expozíció, valamint az alacsonyabb koncentrációk (0,5-2 mg/L) nem eredményeztek jelentős PAFE-t 50% humán szérum jelenlétében, ezért vizsgálataink során 4, 16 és 32 mg/L koncentrációkon vizsgáltuk a CAS által kifejtett PAFE-t 60 perces gyógyszer expozíciós időt alkalmazva normál RPMI-1640-ben és 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640-ben [Nguyen és mtsai. 2009; Shields és mtsai. 2011].

Az idő-ölés kísérletekhez hasonlóan ebben az esetben is $\sim 10^5$ sejt/mL kiindulási csíraszámot alkalmaztunk. Egy óráig tartó 35°C-on történő inkubáció után centrifugálás segítségével összegyűjtöttük a gombasejteket (10 perc, 1500 g), majd steril fiziológiás sóoldatban még háromszor mostuk őket. Ezt követően a sejteket ismételten felvettük 10 mL, meleg, gyógyszermentes RPMI-1640-be, valamint 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640-be.

Az egyes csövekből 0, 4, 8, 12 és 24 h elteltével mintát vettünk (100 μ L), majd a mintákból tízes alapú hígítási sorozatot készítettünk. Az egyes hígításokból kioltottunk SDA táptalajra (4x30 μ L), melyeket 35°C-on 48 óráig inkubáltuk [Nguyen és mtsai. 2009; Shields és mtsai. 2011].

A PAFE időtartama a gyógyszer eltávolítása után a kezelt törzs, valamint a kontroll izolátum egy nagyságrendnyi növekedéséhez szükséges idő különbsége. [Nguyen és mtsai. 2009; Shields és mtsai. 2011].

IV.5. Az *in vitro* adatok elemzése

Fungicidnek tekintettünk egy adott koncentrációt, ha a kezdő csíraszámmal összehasonlítva 99,9%-os vagy nagyobb csíraszám csökkenés volt megfigyelhető [Cantón és mtsai. 2009; Cantón és mtsai. 2010; Földi és mtsai. 2012/b].

Az idő-ölés kísérletek során nyert adatokat felhasználva matematikai összefüggés segítségével a vizsgált koncentrációkon kiszámoltuk a CAS aktivitásának ölési kinetikáját normál RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápfolyadékban. Az ölési kinetikát az alábbi exponenciális egyenlet segítségével számítottuk ki: $N_t = N_0 \times e^{-kt}$, ahol a N_t az élő sejtek száma adott időpontban, az N_0 a kísérlet kezdetén mért élő sejszám, a k az ölési ráta a t pedig az inkubációs idő. A pozitív k érték a gombasejtek ölését, míg a negatív k érték azok növekedését jelenti (GraphPad Prism 4.03, Windows). Az illesztés jóságának

vizsgálatát az r^2 használatával ellenőriztük ($>0,8$) [Cantón és mtsai. 2009; Cantón és mtsai. 2010].

A kiindulási csíraszámokkal összehasonlítva az 50; 90; 99; 99,9%-os sejtszámcsökkenéshez szükséges időt (h) a k értékek alapján számoltuk ki a vizsgált *C. krusei* és *C. inconspicua* törzsek, valamint az egyes CAS koncentrációk esetén ($T_{50}=0,30103/k$; $T_{90}=1/k$; $T_{99}=2/k$; $T_{99,9}=3/k$) [Cantón és mtsai. 2009; Cantón és mtsai. 2010].

A különböző izolátumok és koncentrációk közötti eltéréseket a Tukey-féle teszttel kiegészített egyszempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA) vizsgáltuk mindkét tápközegben. Ugyanazon CAS koncentrációk különböző médiumban kapott értékeinek összehasonlítását T-próbával végeztük. Szignifikánsnak tekintettük az eredményeket, ha $P<0,05$.

IV.6. In vivo kísérletek menete

IV.6.1. A kísérletben felhasznált egerek

A kísérletek során 21-23 g tömegű BALB/c típusú nőstény egereket alkalmaztunk (Charles River Laboratories), melyeket a „Laboratóriumi Állatok Alkalmazása és Gondozása” című útmutatóban leírtak szerint tartottunk. A vizsgált csoportokban 7-9 egér volt. Az *in vivo* kísérletek engedélyszáma: 12/2008 DE MÁB.

A vizsgálat alatt a kísérletben felhasznált egereket cyclophosphamid (Endoxan) intraperitoneális (6. kép) adagolásával immunszuppresszáltuk az alábbi protokoll szerint: a fertőzést megelőző negyedik nap 150 mg/kg, a fertőzés előtti első nap 100 mg/kg, a fertőzést követő második és ötödik nap adott 100 mg/kg [Földi és mtsai. 2012/a].

IV.6.2. A fertőzés menete

Az oltóanyag készítéshez a vizsgált *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumokat két egymást követő napon SDA agarra kioltottuk, majd a felfrissített törzseket 3-4 SDA felületére szélesztettük. 24 órás 35°C-on történő inkubálás után a kinőtt gombapázsitot a táptalajok felszínéről steril vattatamponnal eltávolítottuk és steril fiziológiás sóoldatba elszuszpendáltuk. Ezt követően a szuszpenziókat 3000 g fordulaton 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk. A leülepedett gombasejtekhez 25 mL steril fiziológiás sóoldatot pipettáztunk és újabb 10 percen át centrifugáltuk. Ezután a mosási folyamatot további két alkalommal megismételtük, majd a felülúszó eltávolítása után 8 mL fiziológiás sóoldatot adtunk a gombasejtekhez. Ezután a szuszpenzióból két lépésben 1:10 arányú hígítást készítettünk a

Bürker-kamrában történő számoláshoz. A csíraszám beállítást kvantitatív kioltással ellenőriztük [Földi és mtsai. 2012/a].

Az egereket a laterális farokvénán keresztül fertőztük (0,2 mL gombaszuszpenzió/egér). Előzetes kísérleteink alapján a fertőző dózis, *C. krusei* esetén 4×10^6 , míg *C. inconspicua* esetében 2×10^7 CFU/egér volt. Ezek a dózisok nem okoztak elhullást.

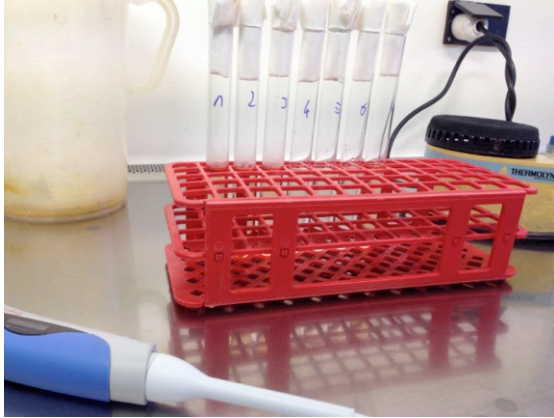
IV.6.3. Antifungális terápia

Az egereken a fertőzést követő 24 órával az alábbi intraperitoneális (6. kép) CAS (Cancidas) kezelési protokollt alkalmaztuk öt napig: 1, 2, 3, 5, 15 mg/kg/nap. A fertőzést követő hatodik napon az egereket cervikális diszlokációval elpusztítottuk, majd felboncoltuk (7. kép). A kvantitatív csíraszám meghatározás céljából a veséket eltávolítottuk (8. kép), majd lemérésük után steril dörzscsészében, steril pistillussal homogenizáltuk (9. kép). Ezt követően a homogenizátumhoz 1 mL steril fiziológiás sóoldatot adtunk, majd az egyes mintákból 1:10-es alapú hígítási sorozatot készítettünk. A különböző hígításokból 100 μ L-t oltottunk ki SDA táptalajra, majd 48 órás 35°C-on történő inkubálás után a kinőtt telepeket megszámloltuk (10. kép). A kimutatás alsó határa 50 sejt/szövet (g) [Földi és mtsai. 2012/a].

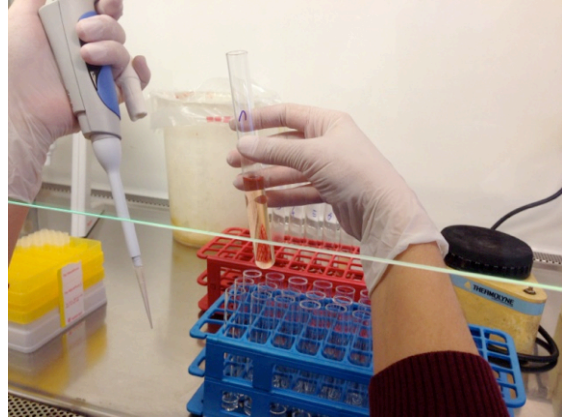
IV.6.4. Statisztikai elemzés

A táptalajon kitenyészett gombák szignifikancia vizsgálatához Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk (GraphPad Prism 4.03, Windows). Szignifikánsnak tekintettük az eredményt ha $P < 0,05$ [Földi és mtsai. 2012/a].

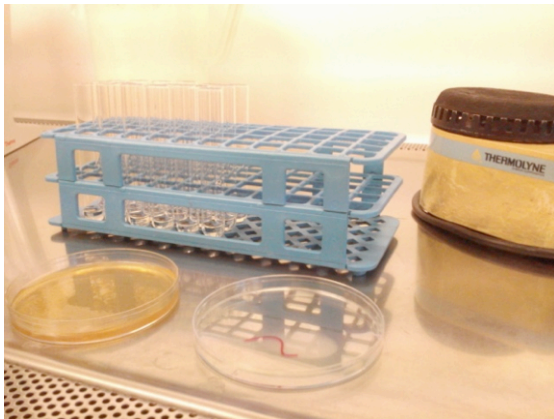
4.7. Az *in vitro* és *in vivo* kísérletek menete képekben



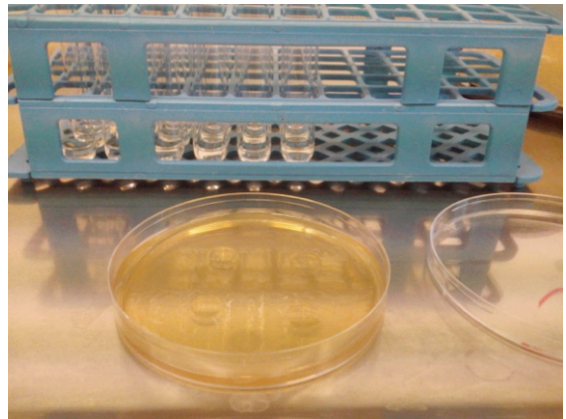
1. kép: Különböző CAS koncentrációkat tartalmazó tápközegek



2. kép: Mintavétel



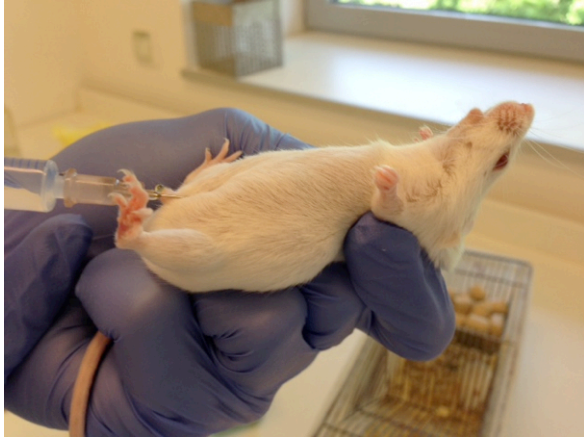
3. kép: Hígítási sorozat



4. kép: Kioltás



5. kép: Gombatelepek



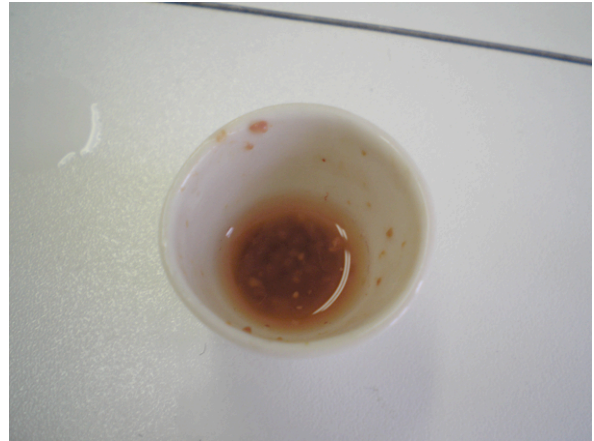
6. kép: Intraperitoneális oltás



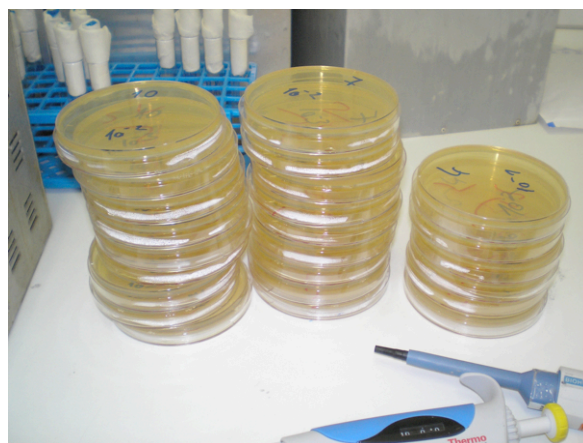
7. kép: Vesék eltávolítása



8. kép: Eltávolított vesék



9. kép: Vesék homogenizálása



10. kép: Hígítási sor készítése és kioltás táptalajra

V. Eredmények

V.1. A caspofungin iránti érzékenység meghatározása makrodilúciós módszerrel

Normál RPMI-1640-ben az összes általunk vizsgált *C. albicans* és *C. krusei* tesztörzs és klinikai izolátum érzékenynek bizonyult CAS ellen a 2011-ben módosított fajspecifikus CLSI határértékeket figyelembe véve. A DPL20 és a DPL45-ös izolátum egyaránt rezisztensnek minősült CAS iránt (2. táblázat) (Pfaller és mtsai. 2011). Bár elfogadott CBP jelenleg nincs *C. inconspicua* esetén, a MIC értékek nem voltak magasabbak a *C. albicans* és a *C. krusei* esetén használt határértékeknél.

50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tesztközegben minden vizsgált *Candida* izolátum MIC értéke növekedett. *C. albicans* esetében 4-16x-os, *C. krusei* esetén 4-8x-os, míg a *C. inconspicua* izolátumok vizsgálatakor 4x-es MIC érték növekedést tapasztaltunk.

Izolátum	MIC (mg/L)		Idő-ölés kísérletek eredménye (mg/L)	
	RPMI-1640	RPMI-1640 + 50% szérum	RPMI-1640	RPMI-1640 + 50% szérum
<i>Candida albicans</i>				
ATCC 10231	0,03	0,5	≥0,03 sztatikus	≥0,5 sztatikus
183	0,03	0,25	≥0,03 sztatikus	≥0,25 sztatikus
3666	0,03	0,125	≥0,03 sztatikus	≥0,25 sztatikus
10920	0,03	0,125	≥0,03 sztatikus	≥0,25 sztatikus
12132	0,015	0,25	≥0,03 sztatikus	≥0,25 sztatikus
DPL20*	4	>32	≥16 sztatikus	Nincs hatás
<i>Candida krusei</i>				
ATCC 6258	0,25	2	≥1 cid	≥8 cid
5029	0,25	2	≥2 cid	≥8 cid
4363	0,25	2	≥8 cid	≥8 cid
27393	0,25	2	≥1 cid	≥16 cid
DPL45**	8	32	≥8 sztatikus	≥32 sztatikus
<i>Candida inconspicua</i>				
12060	0,125	0,5	≥0,5 cid	≥ 1 cid
22027	0,125	0,5	≥0,5 cid	≥0,5 cid
20114	0,06	0,25	≥0,5 cid	≥1 cid

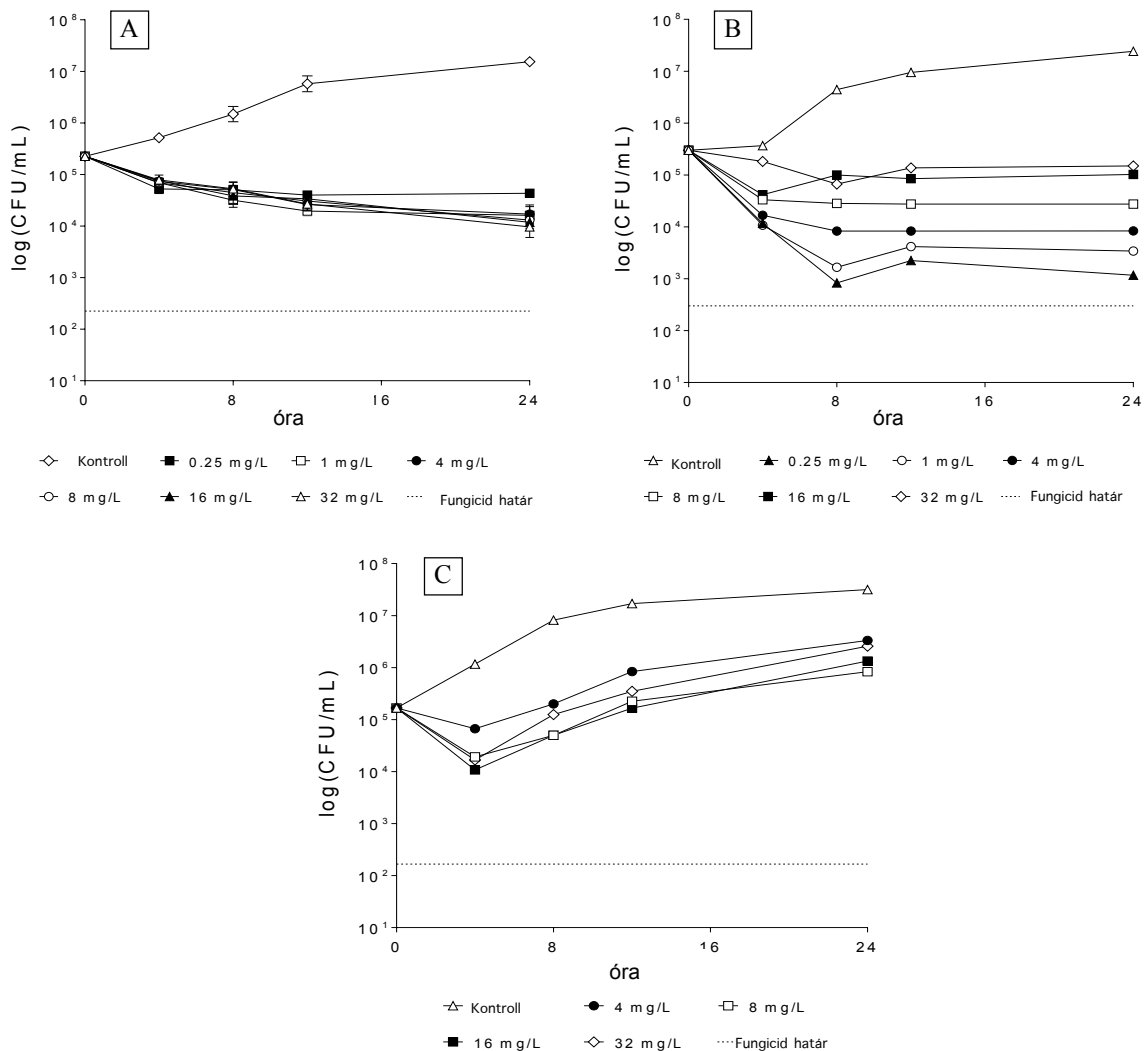
* echinocandin rezisztens *Candida albicans* (FKS F645P)

**echinocandin rezisztens *Candida krusei* (FKS F655F/C)

2. táblázat Az izolátumok caspofungin iránti MIC értékei, valamint az idő-ölés kísérletek során kapott eredmények normál RPMI-1640-ben és 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640-ben.

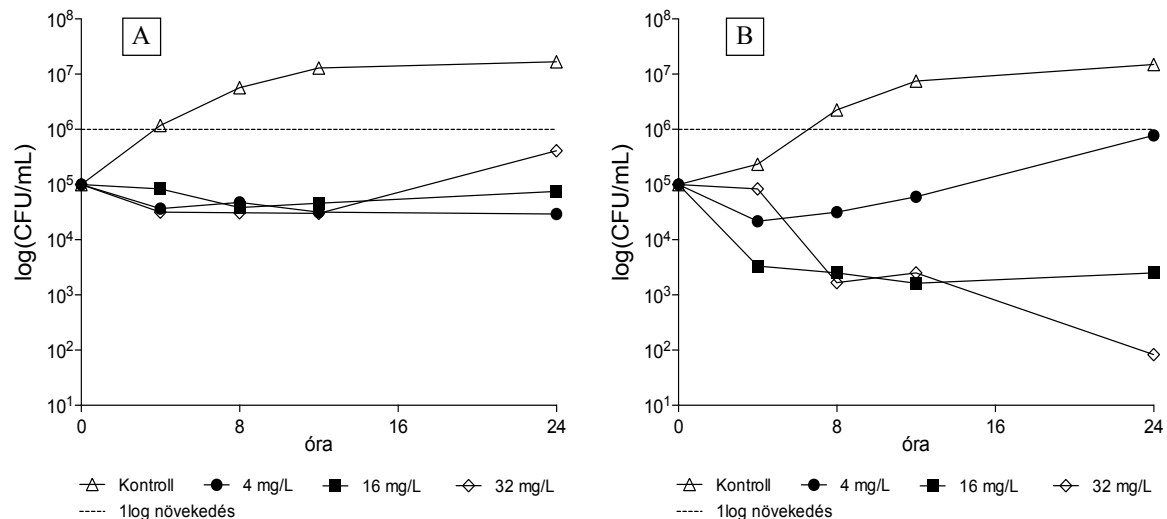
V.2. Az idő-ölés kísérletek és posztantifungális hatás vizsgálatok eredményei RPMI-1640-ben *Candida albicans* izolátumok ellen

Idő-ölés kísérleteink alapján a CAS $\geq 1-2 \times \text{MIC}$ (0,03 mg/L) koncentrációkon fungisztikus hatást fejtett ki a szérumentes RPMI-1640-ben a különböző *C. albicans* klinikai izolátumok, valamint az ATCC 10231-es referencia törzs ellen (2. táblázat) (6A és 6B ábra). Ez a kiindulási csíraszámmal összehasonlítva <99,9%-os sejtszámcsökkenést jelent. A rezisztens izolátum esetében (DPL20) RPMI-1640-ben az első 4 órában sikerült jelentősebb szaporodásgátlást elérni (8-32 mg/L), azonban szérum jelenlétében már semmilyen hatást nem tapasztaltunk (6C és 8C ábra).



6. ábra A caspofungin normál RPMI-1640-ben mutatott idő-ölés görbéi négy klinikai *Candida albicans* izolátum ellen (átlag±standard deviáció) (A) az ATCC 10231-es referencia törzs (B), valamint a DPL20-as izolátum ellen (C).

A PAFE vizsgálatok eredményei alapján szérumentes RPMI-1640-ben a 4, 16 és 32 mg/L-es CAS koncentrációk 4,89- >19,34; 13,84- >19,88 és 7,65- >19,88 óráig gátolták mind a klinikai izolátumok, mind az ATCC 10231-es tesztörzs újránövekedését (3. táblázat) (7A és 7B ábra). A rezisztens *C. albicans* esetében nem tapasztaltunk PAFE-t (3. táblázat).

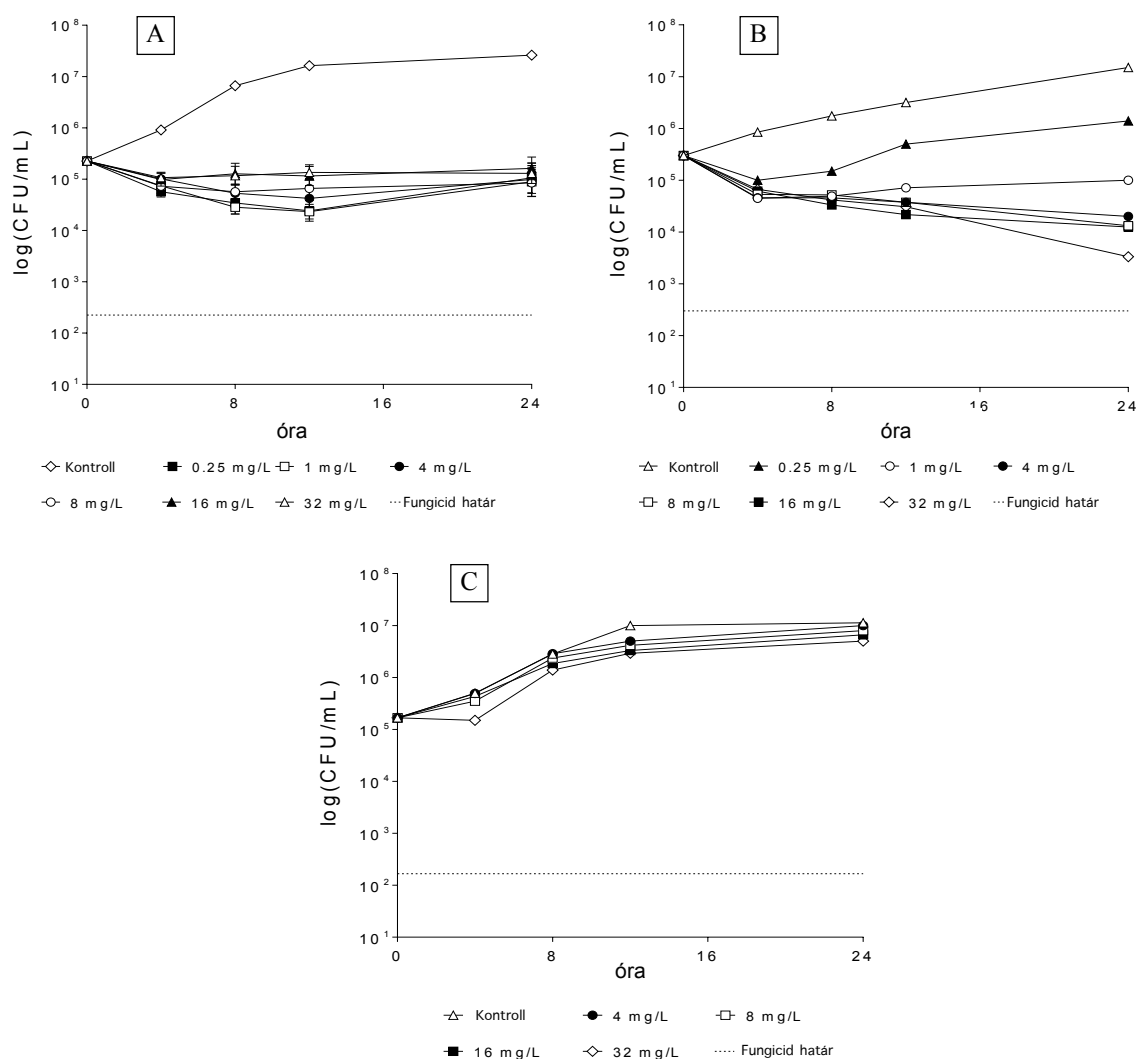


7. ábra A caspofungin által kifejtett posztantifungális hatás RPMI-1640-ben a *Candida albicans* 183-as (A) és 3666-os (B) klinikai izolátuma ellen.

V.3. Az idő-ölés kísérletek és posztantifungális hatás vizsgálatok eredményei RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében *Candida albicans* izolátumok ellen

Általánosságban elmondható, hogy a szérum jelentősen csökkentette a CAS *in vitro* aktivitását mind az idő-ölés, mind a PAFE kísérletekben a vizsgált *C. albicans* izolátumok ellen. A CAS $\geq 1-2 \times$ MIC értékeken fungisztikus hatást fejtett ki a klinikai izolátumok és az ATCC tesztörzs ellen (2. táblázat) (8A és 8B ábra).

A DPL20-as izolátum esetében 50% humán szérum jelenlétében az idő-ölés görbék a kontroll értékekkel összevetve hasonló lefutást mutattak. A legmagasabb vizsgált CAS koncentráció (32 mg/L) 4 óra után minimális csíraszámcsökkenést tapasztaltunk, de ezt követően a 32 mg/L-es koncentrációhoz tartozó idő-ölés görbe is a kontrollal megegyező lefutást mutatott (8C ábra).

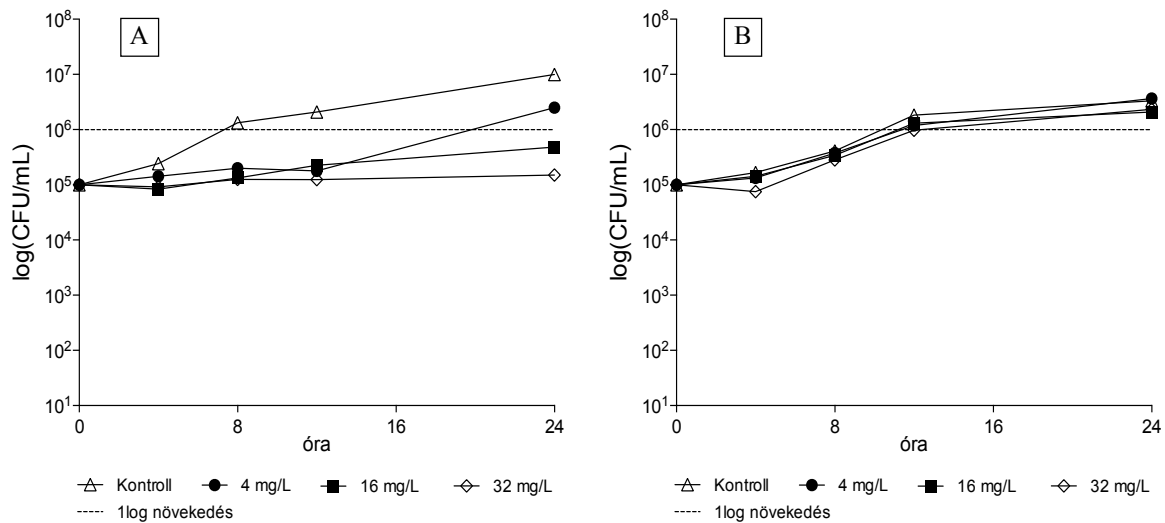


8. ábra A caspofungin RPMI-1640 + 50% humán szérumban mutatott idő-ölés görbéi négy klinikai *Candida albicans* izolátum ellen (átlag±standard deviáció) (A) az ATCC 10231-es referencia törzs (B), valamint a DPL20-as izolátum ellen (C).

A PAFE időtartama 50% szérum jelenlétében jelentősen lecsökkent a vizsgált 4, 16 és 32 mg/L CAS koncentrációkon. A legalacsonyabb vizsgált CAS koncentráción (4 mg/L) a 3666-os és 10920-as izolátum esetében nem tapasztaltunk PAFE-t a szérumos tápközegben (3. táblázat) (9B ábra). A PAFE kísérletek eredményei alapján 50% szérummal kiegészített RPMI-1640-ben a 4, 16 és 32 mg/L-es CAS koncentrációk 0–2,27; 0,24–10,14 és 1,01–>18,79 óráig gátolták mind a klinikai izolátumok, mind az ATCC 10231-es tesztörzs újránövekedését. A szérummentes tápközeghez hasonlóan a DPL20-as izolátum esetében ebben az esetben sem volt mérhető PAFE (3. táblázat).

A PAFE kísérletek eredményei alapján a legtöbb vizsgált izolátum növekedést mutatott a szérumos tápközegben. Négy óra elteltével csupán elvétve detektáltunk csekély mértékű csíraszámcsökkenést. A 183-as izolátum 16 és 32 mg/L, valamint a 3666-os számú törzs 32

mg/L-es CAS koncentrációk jelenlétében mutattak elhanyagolható sejtszámcsökkenést (4. táblázat) (9A és 9B ábra).



9. ábra A caspofungin által kifejtett posztantifungális hatás RPMI-1640 + 50% humán szérumban a *Candida albicans* 183-as (A) és 3666-os (B) klinikai izolátuma ellen.

Fontos kiemelni, hogy a gyógyszermentes tápközegben lévő sejtek egy nagyságrendnyi növekedéséhez szükséges idő mindkét tápközegben hasonló volt (4,12-4,95 óra RPMI-1640-ben, valamint 4,69-5,17 óra 50 % humán szérumban jelenlétében), azaz 50% szérumban nem csökkentette szignifikánsan a kontroll gombasejtek növekedését.

Izolátumok	Médium	A PAFE időtartama (h)		
		4 mg/L	16 mg/L	32 mg/L
183	RPMI-1640	>19,34	>19,34	14,81
	50% szérumban	2,27	10,14	>18,79
3666	RPMI-1640	7,40	>19,23	>19,23
	50% szérumban	0	0,79	1,01
10920	RPMI-1640	>19,05	>19,05	>19,05
	50% szérumban	0	0,24	0,24
12132	RPMI-1640	14,21	13,84	7,65
	50% szérumban	0,60	0,95	3,46
ATCC 10231	RPMI-1640	4,89	>19,88	>19,88
	50% szérumban	0,09	0,34	1,39
DPL20	RPMI-1640	0	0	0
	50% szérumban	0	0	0

3. táblázat A caspofungin által kifejtett posztantifungális hatás (PAFE) időtartama a vizsgált *Candida albicans* izolátumok ellen RPMI-1640-ben és 50% szérumban jelenlétében.

V.4. Az idő-ölés, valamint a posztantifungális hatás vizsgálatokban bekövetkező sejtszámváltozások összehasonlítása a *Candida albicans* izolátumok esetében

A két különböző tesztközeg (RPMI-1640, RPMI-1640 + 50% humán szérum) ugyanazon koncentrációit összehasonlítva, az idő-ölés kísérletekben 50% humán szérum jelenlétében az izolátumok többségénél nagyobb mértékű csíraszámcsökkenés volt megfigyelhető, különösen 32 mg/L-es CAS koncentráción (4. táblázat). A 183, 10920, valamint az ATCC 10231-es tesztörzs esetében 4 mg/L CAS koncentráción RPMI-1640-ben tapasztaltunk nagyobb mértékű ölést (-1,1; -1,23; illetve -1,56 log CFU csökkenés). A 183-as klinikai izolátum vizsgálata során 16 mg/L-es CAS gyógyszerkoncentráción az RPMI-1640-ben szintén nagyobb mértékű az ölés, a szérumos tápközeggel összehasonlítva (1,18 log CFU csökkenés) (4. táblázat).

Ezzel ellentétben a PAFE kísérletek során az ölési aktivitás minden izolátumnál jóval homogénebb volt a vizsgált médium szempontjából. Az összes CAS koncentráción a sejtszámcsökkenés szignifikánsan magasabb volt normál RPMI-1640-ben ($P < 0,05-0,001$) (4. táblázat).

A kísérletek során ugyanazon koncentrációhoz tartozó sejtszámok vizsgálatokor hasonló, bizonyos esetekben pedig nagyobb mértékű csökkenést (a 10920-as és 3666-os izolátumok esetében) tapasztaltunk a rövid CAS expozíciót modellező PAFE vizsgálatokban, mint a 24 órás gyógyszer expozíciót demonstráló idő-ölés kísérletekben. Fontos azonban kiemelni, hogy az 50% szérum az összes izolátum esetében szignifikánsan csökkentette a normál RPMI-1640-ben tapasztalható ölést a PAFE kísérletek során ($P < 0,01-0,001$) (4. táblázat).

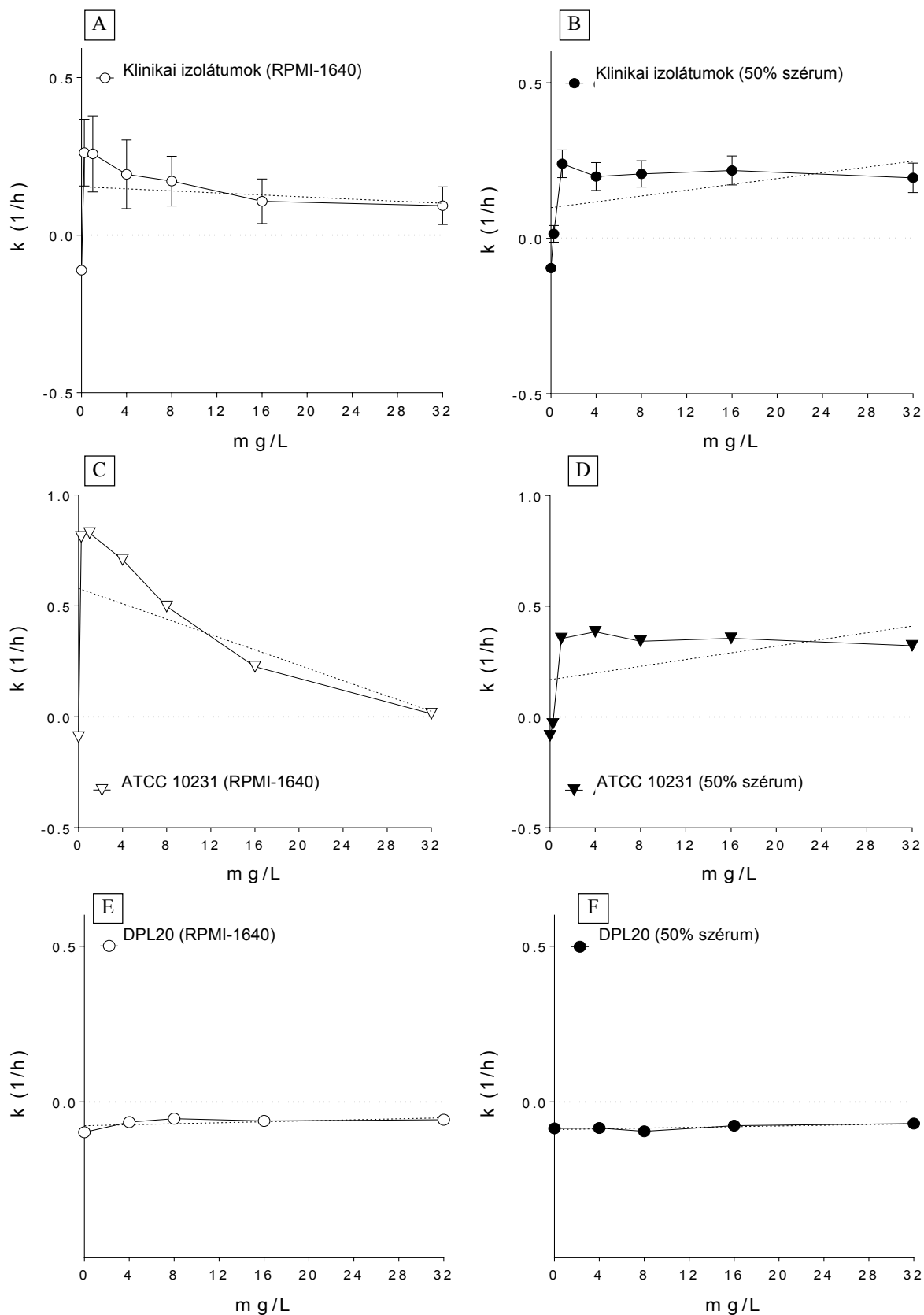
Izolátumok	Médium	Az idő-ölés és posztantifungális hatás vizsgálatokban tapasztalható maximális csíraszám csökkenés (log)					
		4 mg/L		16 mg/L		32 mg/L	
		Idő-ölés	PAFE	Idő-ölés	PAFE	Idő-ölés	PAFE
183	RPMI-1640	-1,1	-0,53	-1,18	-0,42	-0,75	-0,48
	50% szérum	-1,06	+0,37	-0,9	-0,08	-0,9	-0,04
3666	RPMI-1640	-1,38	-0,66	-0,54	-1,6	-0,34	-2,08
	50% szérum	-1,40	+0,13	-1,12	+0,12	-2,68	-0,12
10920	RPMI-1640	-1,23	-1,23	-1,22	-1,48	-0,69	-1,48
	50% szérum	-0,69	+0,49	-1,46	+0,38	-1,43	+0,64
12132	RPMI-1640	-0,44	-0,30	-0,19	-0,27	-0,23	-0,62
	50% szérum	-1,56	+0,67	-1,71	+0,66	-1,86	+0,27
ATCC	RPMI-1640	-1,56	-1,48	-0,55	-2,08	-1,65	-1,78
10231	50% szérum	-1,18	+0,26	-1,38	+0,09	-1,95	+0,08
DPL20	RPMI-1640	-0,39	+0,61	-1,19	+0,78	-1,00	+0,37
	50% szérum	+0,81	+0,84	+0,69	+0,57	-0,05	+0,71

4. táblázat Az idő-ölés és posztantifungális hatás vizsgálatokban tapasztalható maximális csíraszám (CFU/mL) változás RPMI-1640-ben és 50% szérum jelenlétében.

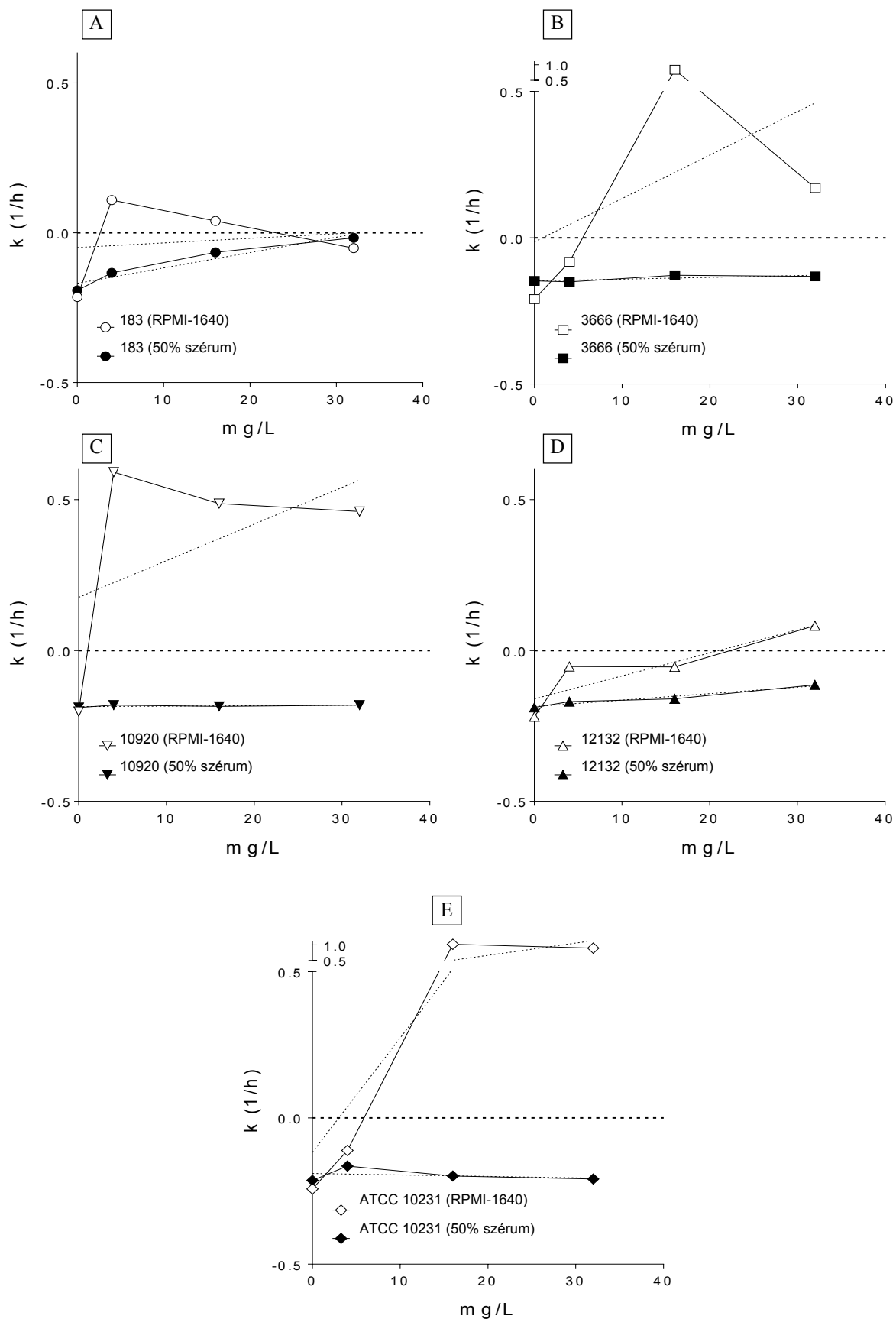
V.5. A caspofungin által kifejtett ölési ráta vizsgálata *Candida albicans* izolátumok ellen

A CAS idő-ölés kísérletekben tapasztalt ölési aktivitása RPMI-1640-ben szignifikánsan gyengébb volt 16-32 mg/L koncentrációkon, mint 0,25, 1, 4 vagy 8 mg/L-es értékeken ($P < 0,05-0,001$) (10A és 10C ábra). Ez a jelenség a mini-paradox hatással magyarázható [Cantón és mtsai. 2010; Walker és mtsai. 2013]. Ötven százalék humán szérum jelenlétében, azonban a CAS 1-32 mg/L koncentrációkon tipikusan koncentráció független módon viselkedett az érzékeny izolátumok ellen (10B és 10D ábra). A DPL20-as törzs esetében a vizsgált médiumtól függetlenül negatív k értékeket detektáltunk, ami a gombák növekedésére utalt (10E és 10F ábra).

A PAFE során vizsgált ölési ráta a klinikai izolátumok és az ATCC 10231-es törzs ellen is izolátum- és koncentráció függő volt (k érték: $-0,111- +1,019$ 1/h) (11A-E ábra). Szérumos tápközegben jóval szűkebb intervallumban mozgott a CAS által kifejtett ölési ráta ($-0,017- -0,185$ 1/h) (11A-E ábra).



10. ábra Az idő-ölés kísérletekben a caspofungin által kifejtett ölési ráta (k) *Candida albicans* klinikai izolátumok ellen RPMI-1640-ben (A) és 50% szérum jelenlétében (B) (átlag±standard deviáció), ATCC 10231 ellen RPMI-1640-ben (C) és 50% szérum jelenlétében (D), valamint a DPL20-as izolátum ellen RPMI-1640-ben (E) és 50% szérum jelenlétében (F). Az ábrákon a pontozott vonal jelöli a regressziós egyenest. A pozitív k érték az élő sejtek számának a csökkenését, a negatív k érték azok növekedését mutatja.

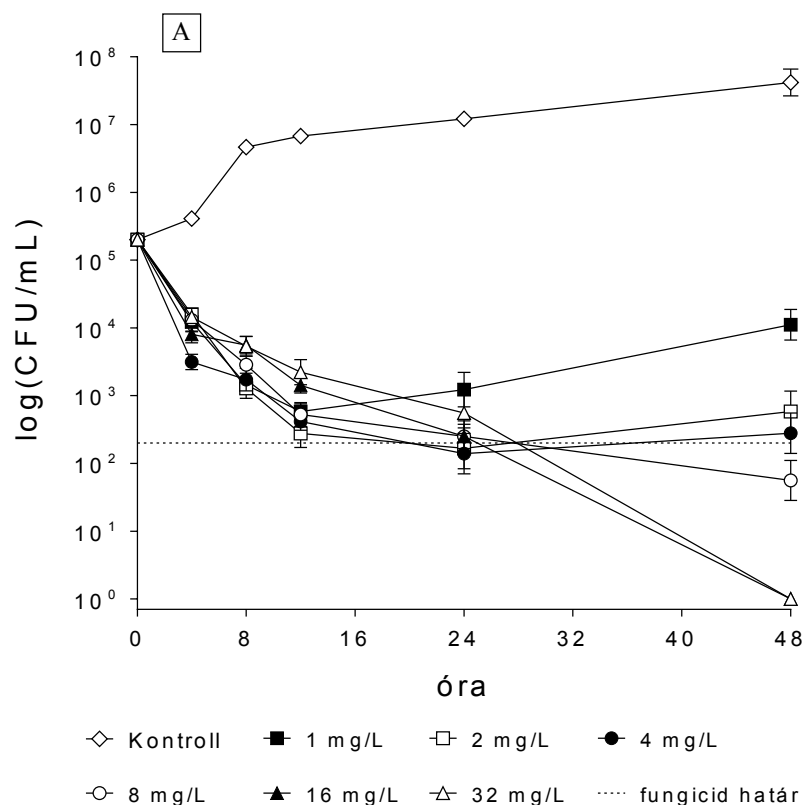


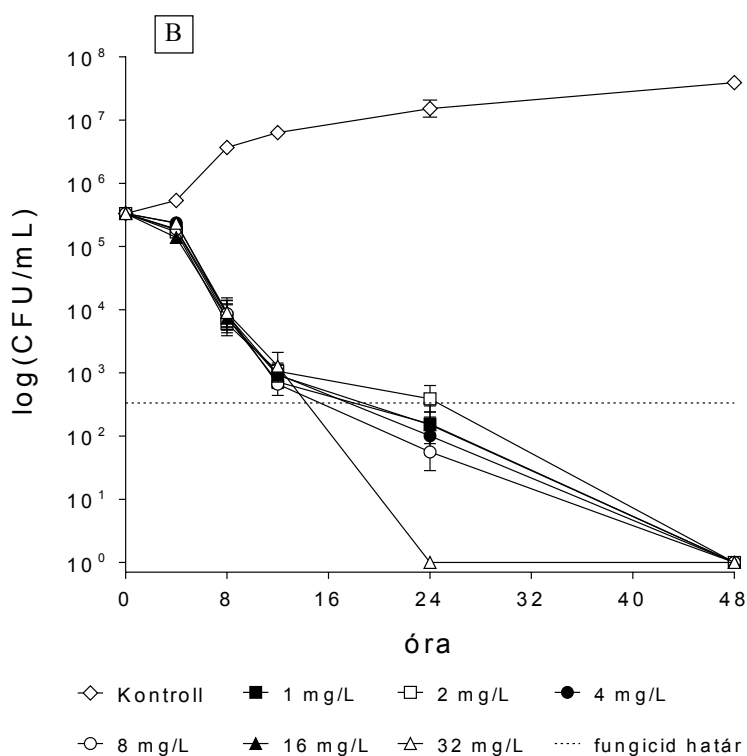
11. ábra A PAFE kísérletekben a caspofungin által kifejtett ölési ráta (k) a *Candida albicans* 183-as (A), 3666-os (B), 10920-as (C), 12132-es (D) klinikai izolátumok, valamint az ATCC 10231-es törzs (E) ellen RPMI-1640-ben és 50% szérum jelenlétében. Az ábrákon pontozott vonal jelöli a regressziós egyenest. A pozitív k érték az élő sejtek csökkenését, a negatív k érték azok növekedését mutatja. A B és E ábra esetében az y tengely beosztását megtörtük a pontosabb ábrázolás kedvéért.

V.6. A caspofungin *in vitro* hatékonyságának meghatározása idő-ölés kísérletekkel RPMI-1640-ben *Candida krusei* és *Candida inconspicua* izolátumok ellen

Szérumentes, RPMI-1640 tápközegben a CAS 24 óra után fungisztikus aktivitást mutatott $\geq 0,25$ mg/L (1 x MIC) koncentrációkon a *C. krusei* klinikai izolátumok ellen, bár a 4363-as törzs esetében újránövekedést figyeltünk meg 0,25-4 mg/L-es értékeken (1-16 x MIC) (12A ábra). A CAS mindhárom *C. krusei* klinikai izolátum ellen fungicid hatást mutatott $3,75 \pm 0,71$, valamint $4,64 \pm 0,33$ óra után 16 és 32 mg/L-es (64-128 x MIC) gyógyszerkoncentrációkon (12A ábra, 5. táblázat). Az ATCC 6258-as tesztörzs esetén az ölés már ≥ 1 mg/L-es (≥ 4 x MIC) CAS koncentrációkon 12-24 h után bekövetkezett. A rezisztens izolátum esetében (DPL45) az első 12 órában ≥ 4 mg/L gyógyszerkoncentrációkon fungisztikus hatást tapasztaltunk, majd 24-48 óra elteltével újránövekedést figyeltünk meg. A 32 mg/L-es (4 x MIC) CAS koncentráció a DPL45-ös törzs ellen viszont fungicidnek bizonyult.

C. inconspicua esetében a CAS már 1 x MIC (0,06 mg/L) koncentrációkon is fungisztikus volt RPMI-1640-ben. Huszonnégy órára mindhárom klinikai izolátumnál a CAS fungicidnek bizonyult $\geq 0,5$ mg/L (4-8 x MIC) koncentrációkon (12B ábra).





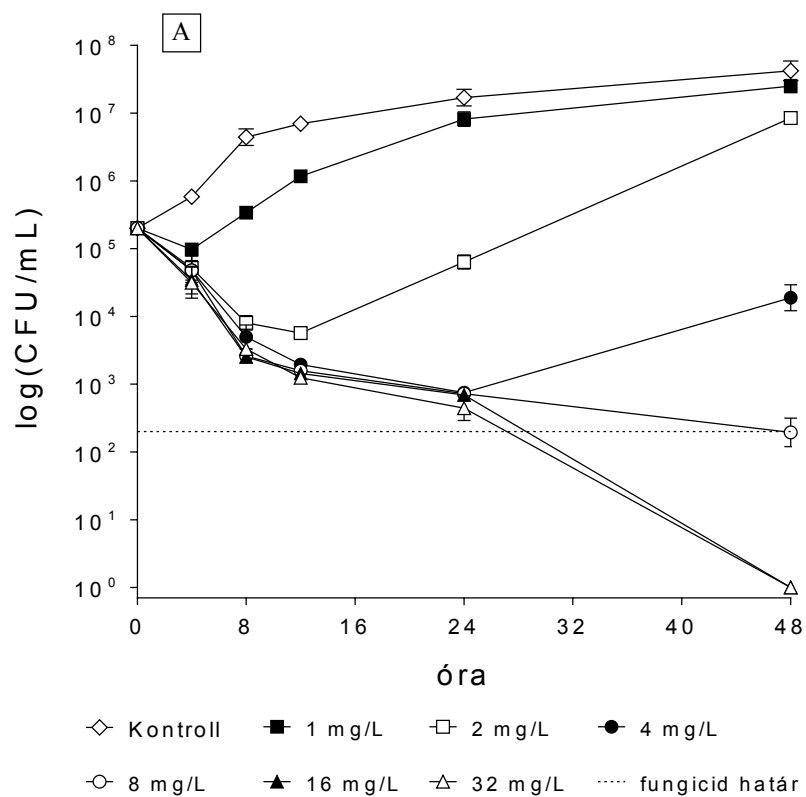
12. ábra A caspofungin idő-ölés görbéi RPMI-1640-ben a három *C. krusei* klinikai izolátum (A) és a három klinikai *C. inconspicua* izolátum ellen (B). Az egyes időpontoknál látható a három izolátum sejtszámának átlaga±standard deviáció. A szaggatott vonal a fungicid határt ábrázolja.

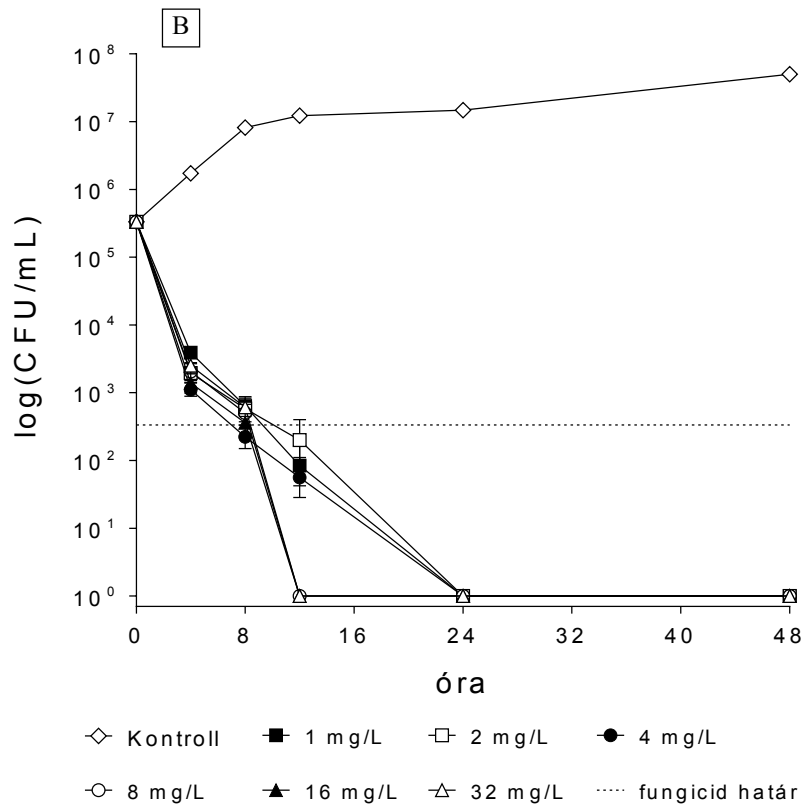
V.7. A caspofungin *in vitro* hatékonyságának meghatározása idő-ölés kísérletekkel RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében *Candida krusei* és *Candida inconspicua* izolátumok ellen

Humán szérum jelenlétében, bár az első 4 órában a CAS 1 mg/L-es koncentráción (0,5 x MIC) mindhárom *C. krusei* klinikai izolátum növekedését gátolta, 12-24 óra elteltével az idő-ölés görbék a kontroll izolátuméhoz hasonló lefutást mutattak (13A ábra). A CAS fungisztatikus hatást mutatott 2-4 mg/L (1-2 x MIC) koncentrációkat vizsgálva a *C. krusei* klinikai izolátumok ellen, 24 óra elteltével azonban újránövekedést tapasztaltunk. A CAS 16 és 32 mg/L koncentrációkon 6,47±3,48, illetve 7,42±5,91 óra alatt fungicid hatású volt a *C. krusei* klinikai izolátumok ellen (13A ábra, 5. táblázat). Az ATCC 6258-as törzs ellen a klinikai izolátumokhoz képest hasonló ölési mintázatot figyeltünk meg. A DPL45-ös rezisztens izolátum vizsgálata során a maximális csíraszámcsökkenést csak a legnagyobb 16-32 mg/L-es CAS koncentrációkon tapasztaltuk, azonban 24-48 óra elteltével ebben az esetben

is a kontroll sejszámához közelítő újránövekedés volt megfigyelhető, ellentétben a szérummentes RPMI-1640-ben tapasztaltakkal.

Az első 24 órában az összes általunk vizsgált *C. inconspicua* izolátum csíraszám a fungicid határérték alá csökkent. Fontos kiemelni, hogy a *C. inconspicua* izolátumok esetében 50% humán szérum jelenlétében jelentősen korábban sikerült elérni a fungicid hatást 1-32 mg/L CAS koncentrációkon, mint a szérummentes normál RPMI-1640 tápközegben (13B ábra).



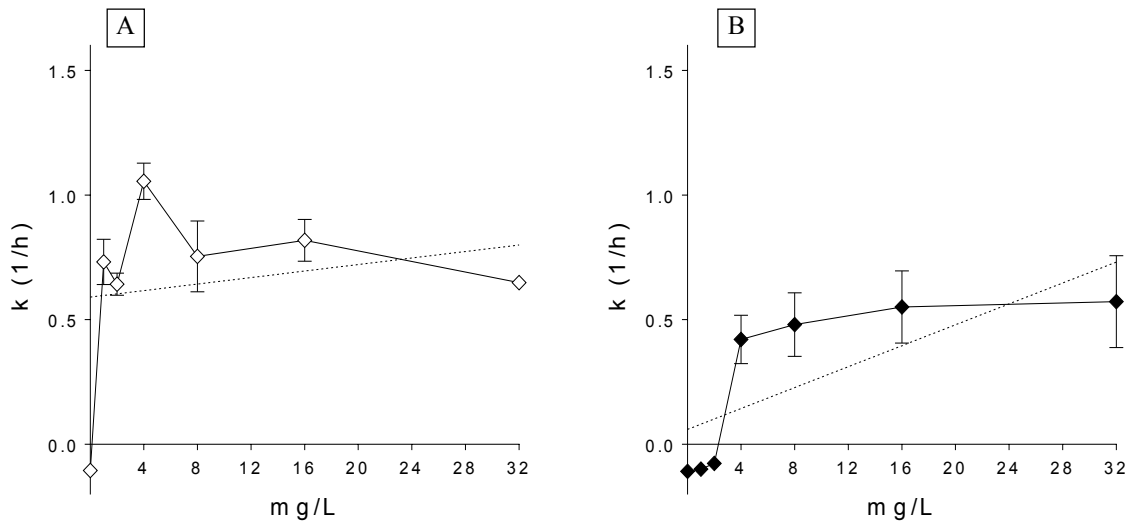


13. ábra A caspofungin idő-ölés görbéi RPMI-1640 + 50% szérum jelenlétében a három *Candida krusei* klinikai izolátum (A) és a három klinikai *Candida inconspicua* izolátum ellen (B). Az egyes időpontoknál látható a három izolátum sejtszámának átlag±standard deviáció. A szaggatott vonal a fungicid határt ábrázolja.

V.8. A caspofungin által kifejtett ölési ráta vizsgálata *Candida krusei* és *Candida inconspicua* izolátumok ellen

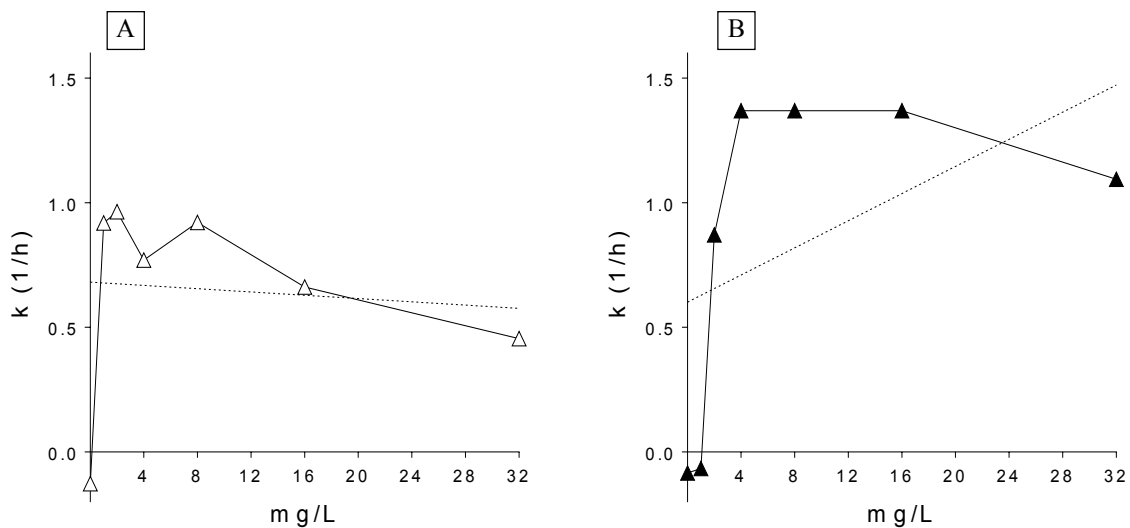
In vitro vizsgálataink alapján az ölési ráta és a vizsgált CAS koncentrációk közötti kapcsolat mindkét vizsgált médiumban mindkét *Candida* faj esetében linearitást mutatott. Érdekes módon a *C. krusei* klinikai izolátumok vizsgálata során a legmagasabb ölési rátát 4 mg/L koncentráción tapasztaltuk normál RPMI-1640-ben. Ez szignifikánsan magasabb volt, mint a 2 és 32 mg/L-es CAS koncentrációkon tapasztalt *k* értékek ($P < 0,05$) (14A ábra).

Szérum jelenlétében a hatékony CAS koncentrációkon (4-32 mg/L) az átlagos *k* értékek (0,42–0,57 1/h) között nem volt szignifikáns különbség ($P > 0,05$), tehát szérum jelenlétében az ölés koncentráció független módon történt az effektív CAS koncentrációkon (14B ábra). Az 1, 2 és 4 mg/L CAS által kifejtett ölési ráta szignifikánsan magasabb volt normál RPMI-1640-ben összehasonlítva a szérumot tartalmazó tápközeggel ($P < 0,01-0,005$) (14A és 14B ábra).



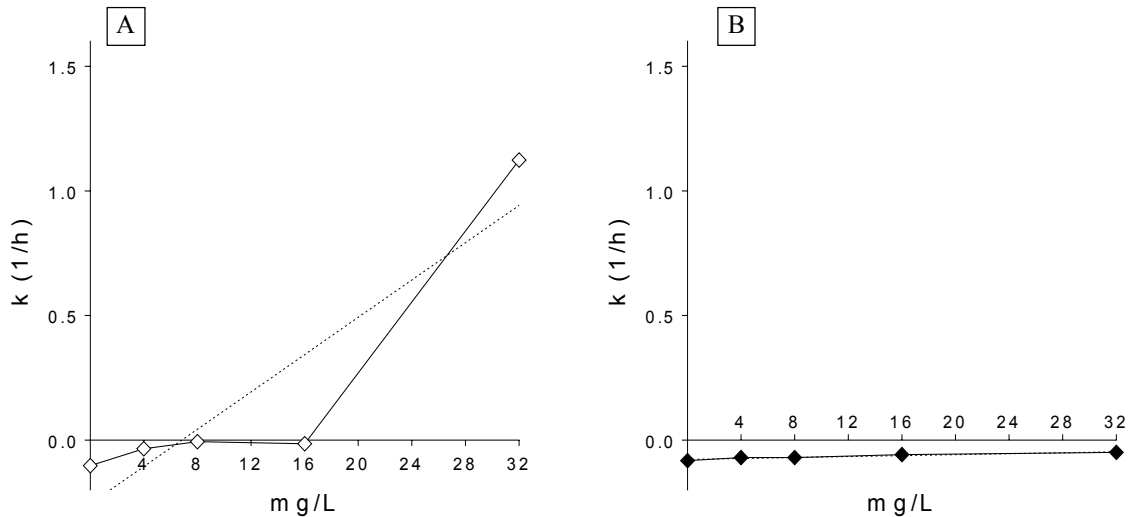
14. ábra A caspofungin által kifejtett ölési ráta a 3 vizsgált *Candida krusei* klinikai izolátum (5029, 4363, 27393) esetén RPMI-1640-ben (A), valamint 50% humán szérum jelenlétében (B). A szaggatott vonal a regressziós egyenest szimbolizálja.

A *C. krusei* ATCC 6258 referencia izolátum esetében 2-32 mg/L CAS koncentráción a mért k értékek 0,46–0,96 1/h között változtak RPMI-1640-ben (15A ábra). Ezzel szemben az ölési ráta 0,87–1,37 1/h-re változott 50% humán szérum jelenlétében (15B ábra). A tesztörzs vizsgálata során a 8 és 16 mg/L-es CAS koncentrációkon mért ölési ráta szignifikánsan magasabb volt a szérumos tápközegben mint normál RPMI-1640-ben ($P < 0,01$) (15B ábra).



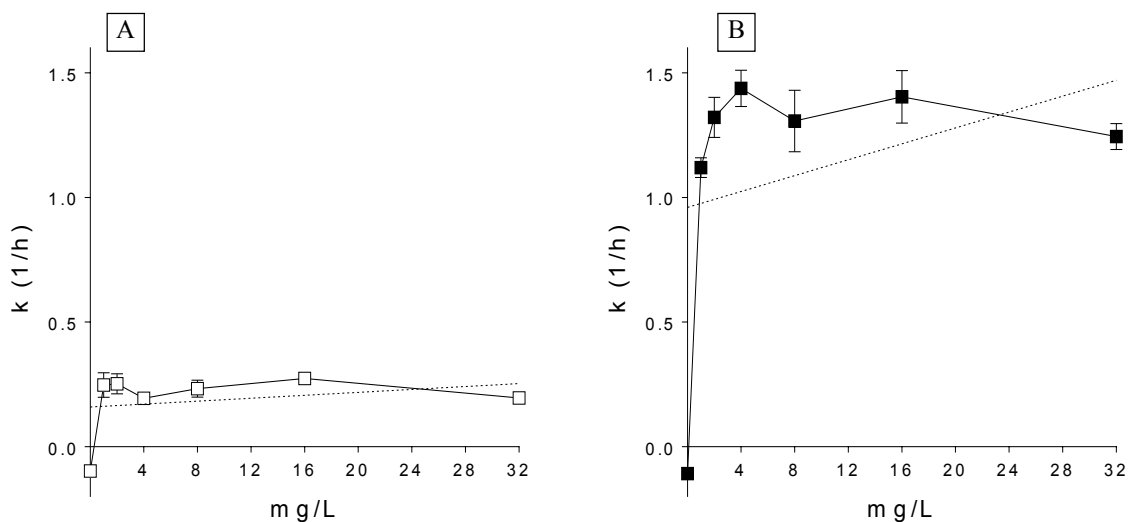
15. ábra A caspofungin által kifejtett ölési ráta a *Candida krusei* ATCC 6258-as tesztörzs esetén RPMI-1640-ben (A), valamint 50% humán szérum jelenlétében (B). A szaggatott vonal a regressziós egyenest szimbolizálja.

A CAS rezisztens DPL45-ös izolátum esetében a 32 mg/L CAS koncentráción RPMI-1640-ben mért öléstől (1,12 1/h) eltekintve sem RPMI-1640-ben sem az 50% humán szérummal kiegészített tápközegben nem tapasztaltunk ölést (16A és 16B ábra).



16. ábra A caspofungin által kifejtett ölési ráta a *Candida krusei* DPL45-ös rezisztens izolátum esetén RPMI-1640-ben (A), valamint 50% humán szérum jelenlétében (B). A szaggatott vonal a regressziós egyenest szimbolizálja.

A *C. krusei* klinikai izolátumokkal ellentétben, az 50% humán szérum szignifikánsan fokozta a CAS ölési aktivitását az összes tesztelt koncentráción (1-32 mg/L; 1,12–1,44 1/h) a vizsgált *C. inconspicua* izolátumok ellen ($P < 0,0003$) (17A és 17B ábra).



17. ábra A caspofungin által kifejtett ölési ráta a 3 vizsgált *Candida inconspicua* klinikai izolátum (12060, 22027, 20114) esetén RPMI-1640-ben (A), valamint 50% humán szérum jelenlétében (B). A szaggatott vonal a regressziós egyenest szimbolizálja.

	1 mg/L CAS		2 mg/L CAS		4 mg/L CAS		8 mg/L CAS		16 mg/L CAS		32 mg/L CAS	
	RPMI*	Szérum**	RPMI	Szérum	RPMI	Szérum	RPMI	Szérum	RPMI	Szérum	RPMI	Szérum
C. krusel ATCC 6258												
T50	0,328	növekedés	0,312	0,346	0,391	0,219	0,327	0,219	0,455	0,219	0,662	0,275
T90	1,089	növekedés	1,058	1,148	1,299	0,731	1,087	0,731	1,512	0,731	2,199	0,914
T99	2,178	növekedés	2,076	2,297	2,999	1,461	2,173	1,461	3,023	1,461	4,199	1,828
T99,9	3,267	növekedés	3,113	3,445	3,889	2,191	3,259	2,191	4,535	2,191	6,599	2,742
C. krusel (3 Klinikai izolátum)												
T50	0,43±0,10	növekedés	0,47±0,06	növekedés	0,29±0,04	0,81±0,33	0,43±0,14	0,77±0,47	0,35±0,03	0,65±0,35	0,47±0,03	0,75±0,59
T90	1,41±0,32	növekedés	1,57±0,18	növekedés	0,96±0,12	2,76±0,96	1,40±0,50	2,56±1,57	1,25±0,24	2,16±1,16	1,55±0,11	2,47±1,87
T99	2,83±0,64	növekedés	3,14±0,37	növekedés	1,91±0,24	5,32±2,18	2,80±1,0	5,12±3,13	2,50±0,47	4,32±2,32	3,09±0,22	4,95±3,94
T99,9	4,24±>48	növekedés	4,37±>48	növekedés	3,01±>48	>48	4,2±>48	7,68±>48	3,75±0,71	6,47±3,48	4,64±0,33	7,42±5,91
C. krusel DPL45 (echinocandin rezisztens)												
T50	nincs adat	nincs adat	nincs adat	nincs adat	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	0,27	növekedés
T90	nincs adat	nincs adat	nincs adat	nincs adat	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	0,89	növekedés
T99	nincs adat	nincs adat	nincs adat	nincs adat	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	1,78	növekedés
T99,9	nincs adat	nincs adat	nincs adat	nincs adat	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	növekedés	2,67	növekedés
C. inconspicua (3 Klinikai izolátum)												
T50	1,27±0,52	0,27±0,02	2,09±1,29	0,23±0,02	1,57±0,19	0,21±0,02	1,35±0,31	0,24±0,01	1,13±0,15	0,22±0,03	1,58±0,32	0,24±0,02
T90	4,41±1,64	0,89±0,05	4,21±1,37	0,76±0,08	6,21±2,27	0,69±0,06	4,47±1,04	0,78±0,12	3,69±0,51	0,72±0,10	5,24±1,05	0,81±0,06
T99	8,82±3,28	1,79±0,11	8,43±2,75	1,52±0,16	10,43±1,29	1,39±0,13	8,94±2,08	1,56±0,25	7,39±1,02	1,44±0,2	10,48±2,1	1,61±0,12
T99,9	13,24±4,92	2,67±0,16	12,64±4,1 2	2,29±0,24	15,64±1,93	2,09±0,19	13,4±3,12	2,34±0,36	11,09±1,53	2,16±0,3	15,73±3,16	2,42±0,18

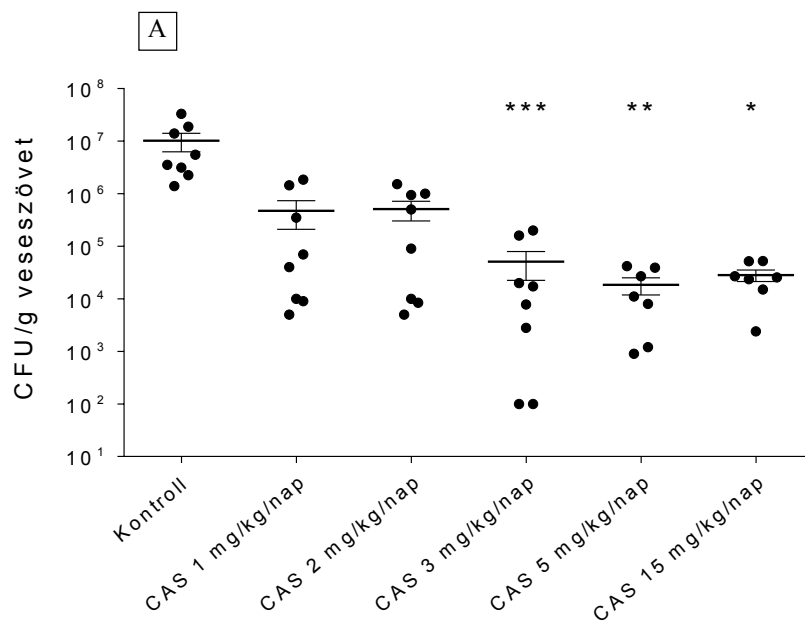
*RPMI: RPMI-1640 **Szérum: RPMI-1640 + 50% humán szérum

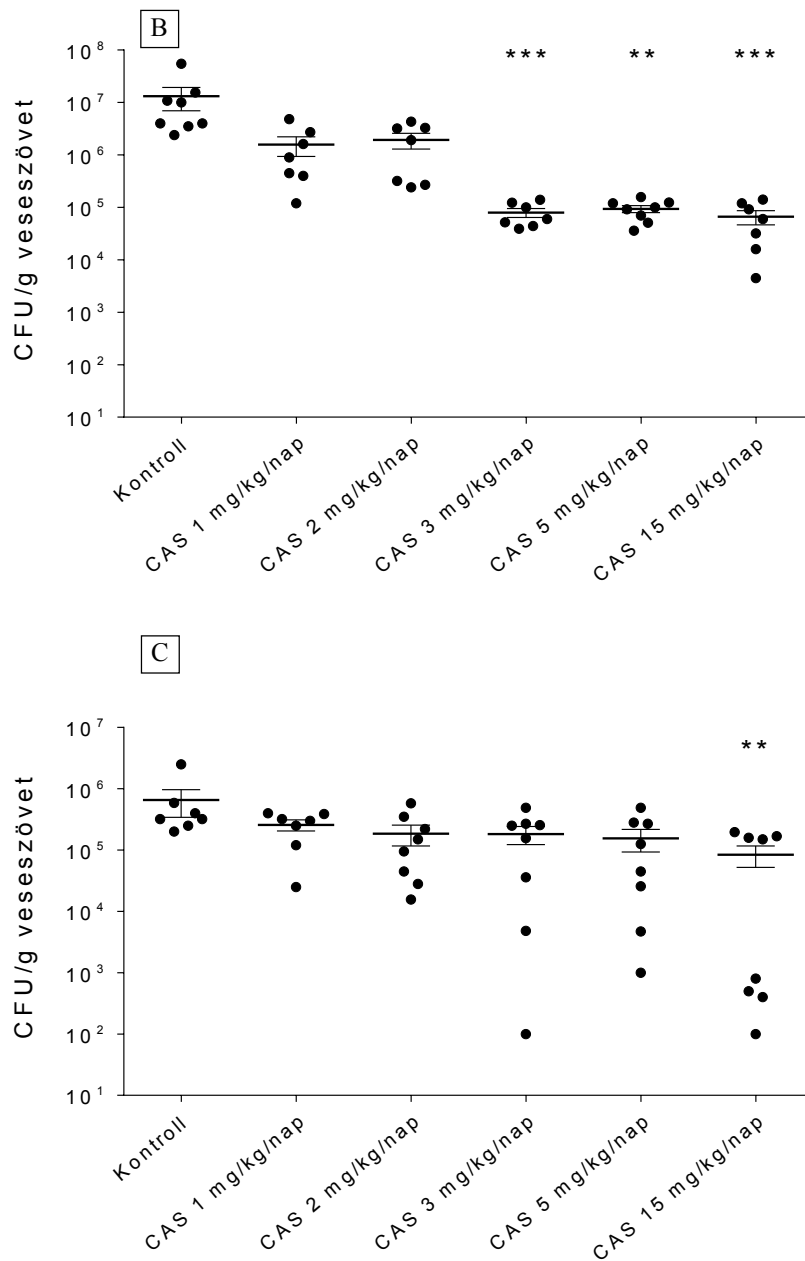
5. táblázat A kiindulási csíraszámhoz képesti 50 (T50), 90 (T90), 99 (T99) és 99,9%-os (T99,9) növekedés csökkenéséhez szükséges átlagos idő (h) ± standard deviáció,

V.9. A caspofungin *in vivo* hatékonyságának vizsgálata *Candida krusei* izolátumok ellen

In vivo kísérleteinkben két *C. krusei* klinikai izolátumot (5029, 27393), valamint egy echinocandin rezisztens törzset vizsgáltunk (DPL45). Bár az általunk használt CAS dózisok mindegyike csökkentette a veséből kinőtt csíraszámot a kontroll csoporttal összehasonlítva, szignifikáns gombasejtszám csökkenést csak a 3, 5 és 15 mg/kg napi CAS dózis eredményezett ($P < 0,05$ - $0,001$). Az 1 és 2 mg/kg napi CAS dózis nem volt hatékony. Fontos kiemelni, hogy a terápia szempontjából hatékony dózisok között nem volt szignifikáns különbség ($P > 0,05$) (14A és 14B ábra).

A rezisztens izolátum esetében a kontroll csoporttal összevetve csak a legnagyobb CAS dózis (15 mg/kg/nap) csökkentette szignifikánsan az élő gombasejtek számát ($P < 0,01$) (14C ábra).





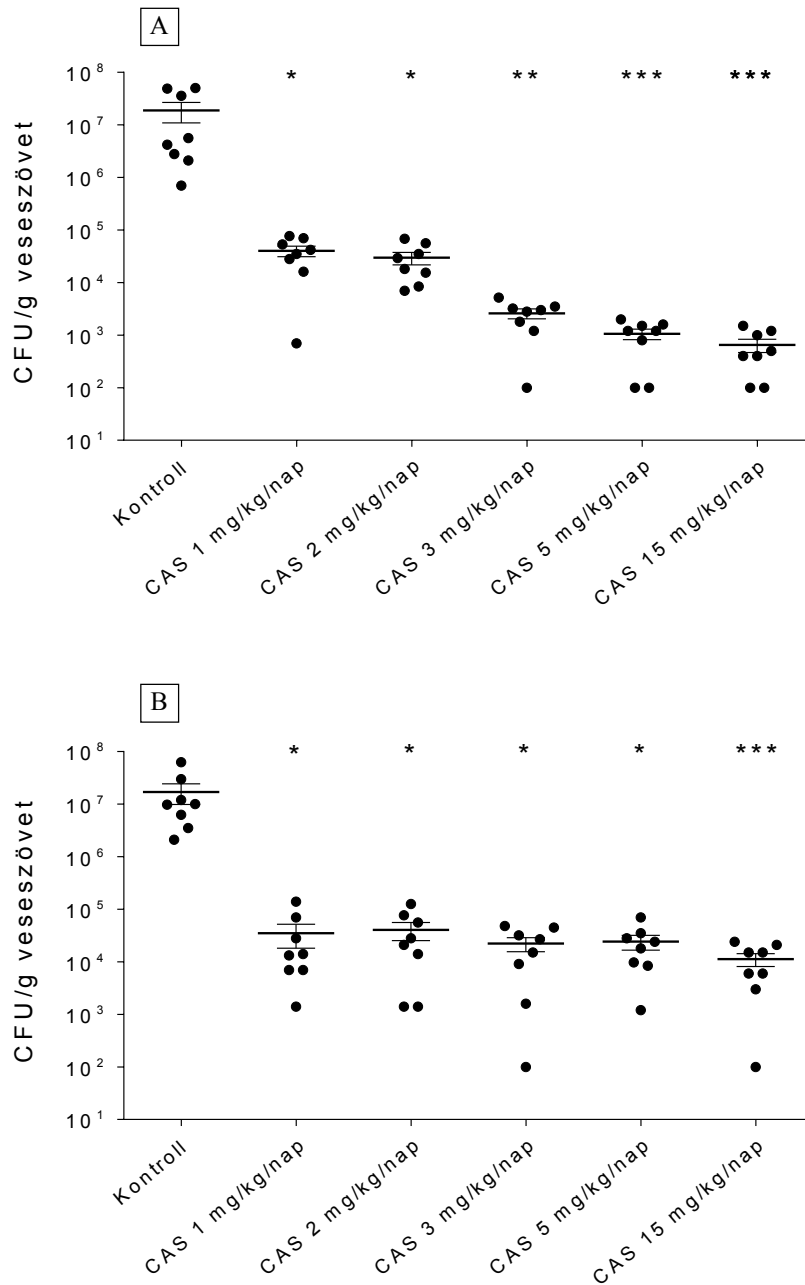
14. ábra A caspofungin *in vivo* hatékonysága a *Candida krusei* 27393 (A), 5029 (B) és a DPL45(C) izolátummal fertőzött neutropéniás egérmodellben. A vesékből kitenyészett túlélő gombasejtszám logaritmusát a tesztelt dózisok függvényében ábrázoltuk (átlag±SEM).

(*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001)

V.10. A caspofungin *in vivo* hatékonyságának vizsgálata *Candida inconspicua* izolátumok ellen

Az általunk tesztelt két *C. inconspicua* izolátum esetében (20114, 22027) az összes alkalmazott dozírozási stratégia szignifikánsan és legalább két nagyságrenddel csökkentette a vesékből kitenyészett élő sejtek számát a kontroll csoporttal összehasonlítva (P<0,05-0,001). A 20114-es *C. inconspicua* törzs esetében a vesékből kitenyészett gombák száma legalább

négy nagyságrendnyi csökkenést mutatott az 5 és 15 mg/kg napi CAS dózissal kezelt egerek vizsgálata során. A hatékony kezelések között statisztikailag szignifikáns különbséget ezekben az esetekben sem tapasztaltunk ($P > 0,05$) (15A és 15B ábra).



15. ábra A caspofungin *in vivo* hatékonysága a *Candida inconspicua* 20114 (A) és a 22027 (B) izolátummal fertőzött neutropéniás egérmódelben. A vesékből kitenyészett túlélő gombasejtszám logaritmusát a tesztelt dózisos függvényében ábrázoltuk (átlag±SEM).

(* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$)

V.11. A kísérleti munkában részt vevő társszerzők munkájának ismertetése

Az értekezés alapjául szolgáló két közlemény elkészítése során a társszerzők az alábbi fázisokban működtek közre:

R Kovács, R Gesztelyi, R Berényi, M Domán, G Kardos, B Juhász, L Majoros. Killing rates exerted by caspofungin in 50% serum and its correlation with *in vivo* efficacy in a neutropenic murine model against *Candida krusei* and *Candida inconspicua*. Journal of Medical Microbiology. 2014, 63(2):186-194.

A klinikai minták beszerzése és azonosítása: Kovács Renátó, Domán Marianna, Berényi Réka.

Az izolátumok MIC értékének meghatározása: Kovács Renátó, Domán Marianna, Berényi Réka.

Idő-ölés kísérletek elvégzése RPMI-1640 és 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben: Kovács Renátó, Domán Marianna, Berényi Réka.

In vivo kísérletek elvégzése: Kovács Renátó, Domán Marianna, Berényi Réka, Dr. Juhász Béla
Statisztikai analízis: Dr. Gesztelyi Rudolf

A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Kovács Renátó, Dr. Kardos Gábor, Dr. Majoros László.

Kézirat revízió: dr. Majoros László

R Kovács, R Gesztelyi, D Perlin, G Kardos, M. Domán, R. Berényi, L. Majoros. Killing rates for caspofungin against *Candida albicans* after brief and continuous caspofungin exposure in the presence and absence of serum. Elfogadva DOI: 10.1007/s11046-014-9799-4 (Mycopathologia)

A klinikai minták beszerzése és azonosítása: Kovács Renátó, Domán Marianna, Berényi Réka

Az izolátumok MIC értékének meghatározása: Kovács Renátó, Domán Marianna, Berényi Réka.

Idő-ölés kísérletek elvégzése RPMI-1640 és 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben: Kovács Renátó, Domán Marianna, Berényi Réka.

A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Kovács Renátó, Domán Marianna, Berényi Réka, Kardos Gábor, Gesztelyi Rudolf, David Perlin, Majoros László

Kézirat revízió: dr. Majoros László

VI. Megbeszélés

Az elmúlt három évtizedben, a különböző gombák okozta fertőzések jelentik talán az egyik legnagyobb egészségügyi kihívást az immunszuppresszált betegek, valamint a súlyos alapteregséggel rendelkező hospitalizált páciensek körében.

Az összes invazív gombafertőzés 70-90%-ért a különböző *Candida* fajok tehetőek felelőssé [Delaloye és mtsai. 2014]. Bár még mindig a *C. albicans* a leggyakrabban izolálható humán patogén gomba, a FLU terápia, illetve profilaktikus használata következtében egyre inkább nő a kockázata a genetikusan, valamint a szerzett FLU rezisztenciával rendelkező *Candida* fajok (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. inconspicua*) okozta fertőzéseknek [Lass-Flörl 2009]. A *Candida* specíesek által kiváltott infekciók nemcsak egészségügyi, hanem jelentős gazdasági relevanciával is rendelkeznek, mivel az invazív fertőzések kezelésének kórházi költsége betegenként akár 35000-40000 amerikai dollár is lehet [Fridkin és mtsai. 2005].

A szisztémás *Candida* fertőzések kezelésére a 2000-es évek elején egy új antimikotikum csoport került bevezetésre a klinikumba, az echinocandinok családja. Az IDSA (Infectious Diseases Society of America) 2009-es ajánlása szerint az echinocandinok jelenleg az elsőként választandó szerek a kritikus állapotban lévő, klinikailag instabil, illetve FLU profilaxisban részesült betegek körében, továbbá olyan *Candida* infekciókban, ahol a kórokozó csökkent FLU érzékenységgel rendelkezik [Pappas és mtsai. 2009]. Ennek következtében az echinocandin felhasználás az elmúlt években több kórházban is jelentősen növekedett [Forrest és mtsai. 2008].

A 2001-ben bevezetett CAS, hasonlóan a többi echinocandinhoz hasonlóan koncentrációfüggő farmakodinámiás aktivitást mutat az érzékeny gombákkal szemben [Andes 2006].

A CAS jelenleg érvényben lévő dozírozási stratégiája a naponta alkalmazott alacsony dózisokon alapszik (70 mg telítő dózis utána 50 mg/nap fenntartó dózisok). A fentiekben leírt farmakodinámiás aktivitás miatt a nagyobb dózisok egyszeri alkalmazása, azonban elméletileg fokozhatja a klinikai hatékonyságot. Ember esetében a maximálisan tolerálható napi dózis MICA esetében 900 mg, míg a CAS vizsgálata során 210 mg volt [Sirohi és mtsai. 2006, Cornely és mtsai. 2011]. A dóziseszkáláció klinikai relevanciája azonban egyelőre kérdéses. Pappas és munkatársai 100, illetve 150 mg napi MICA dózis klinikai hatékonyságát hasonlították össze. Kísérletük eredményei alapján, bár a 100 mg/nap és 150 mg/nap MICA kezelési stratégia biztonságos és hatékony alternatívája lehet a standard CAS terápianak, vizsgálataik során nem találtak semmilyen előnyt, ami indokolná a 150 mg napi MICA dózis

alkalmazását a kisebb 100 mg/nap MICA terápiával szemben [Pappas és mtsai. 2007]. Betts és munkacsoportja 204 invazív candidiasisban szenvedő beteg bevonásával hasonlította össze a tradicionális CAS terápiát (70 mg egyszeri, majd 50 mg-os napi fenntartó dózisok) napi 150 mg-os CAS kezelésekkel. Vizsgálataikban nem volt szignifikáns különbség a hagyományos CAS kezelés és az emelt dózisú terápia között [Betts és mtsai. 2009].

Egy másik vizsgálatban 321 nyelőcső candidiasisban szenvedő beteget vizsgáltak, amelyben két MICA kezelési sémát hasonlítottak össze. A betegek közül 189-en napi 150 mg-os MICA terápiában részesült, míg 132 páciens esetében kétnaponta adagolt 300 mg-os MICA kezelést alkalmaztak. Vizsgálatukban a két dozírozási protokollhoz tartozó AUC_{0-48} medián értékei között nem volt jelentős különbség (150 mg/nap: 304 mg*h/L; 300 mg/kétnaponta: 303 mg*h/L). A ritkábban alkalmazott nagyobb dózisok tehát ebben az esetben sem eredményeztek jobb terápiás kimenetelt [Andes és mtsai. 2013].

A dózis növeléséből származó klinikai hatékonyságot az echinocandinok, köztük a CAS nagyfokú fehérjekötődése ($\geq 96,6\%$) jelentősen befolyásolja [Chen és mtsai. 2011; Mukherjee és mtsai. 2011]. *In vitro* kísérleteinkben ezen hatás demonstrálására 50% humán szérumot alkalmaztunk. Sajnos a szérum használaton alapuló érzékenységet meghatározó módszerek egyelőre nem standardizáltak, így diagnosztikai alkalmazásuk jelenleg nem elfogadott [Nasar és mtsai. 2013]. Fontos azonban kiemelni, hogy ezek a vizsgálatok jobban demonstrálhatják az *in vivo* lezajló folyamatokat. A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján a CAS *in vivo*, illetve klinikai hatékonyságát két fő tényezőnek tulajdonítják. Az egyik a normál RPMI-1640-ben mért relatíve hosszú PAFE, míg a másik tényező a CAS szöveti perzisztenciája. A PAFE fontosságát támasztotta alá Clancy és munkatársai által 2006-ban publikált *in vitro* tanulmány. Eszerint a PAFE tehető felelőssé az ölés jelentős részéért, mivel mind a rövid CAS expozíció (PAFE kísérlet) mind pedig a tartós CAS expozíció (idő-ölés kísérlet) esetén 100%-ig hasonló volt az ölés mértéke RPMI-1640-ben, továbbá a vizsgált *C. albicans* izolátumok újranovekedése legalább 24 óráig gátolva volt [Clancy és mtsai. 2006].

Kísérleteink során megvizsgáltuk a rövid ideig tartó (1 óra), illetve a folyamatosan jelenlévő (24 óra) CAS által kifejtett ölési rátát a leggyakoribb *Candida* faj, a *C. albicans* ellen normál RPMI-1640-ben illetve 50% humán szérummal kiegészített tápközegben. Ezt követően pedig két klinikailag relevánsnak mondható, primer FLU rezisztenciával bíró *Candida* faj (*C. krusei*, *C. inconspicua*) *in vitro* érzékenységét hasonlítottuk össze a már fentebb említett kétféle tesztmédiumban. Legvégül, a CAS dózis eszkaláció *in vivo* hatékonyságát vizsgáltuk *C. krusei*, illetve *C. inconspicua* izolátumokkal fertőzött neutropéniás egérmodellben.

Shields és munkatársai 2011-es tanulmányukban a rövid CAS expozíció PAFE-ra kifejtett hatását vizsgálták öt *C. albicans* izolátum ellen RPMI-1640-ben. Kísérleteikben 4 x MIC érték, illetve 8 mg/L CAS koncentrációk közötti értékeket vizsgáltak. Nyolc mg/L-es koncentrációval szimulálták az 50 mg-os adagolással *in vivo* elérhető CAS csúcskoncentrációt. PAFE vizsgálataikban 24 óráig fennálló koncentrációfüggő ölést figyeltek meg. Ráadásul a maximális PAFE-t már 5, illetve 15 perc CAS expozíció után tapasztalták. További érdekesség, hogy a rövid ideig fennálló CAS expozíció eliminálta az idő-ölés kísérletekben megfigyelt paradox növekedést [Shields és mtsai. 2011]. A PAFE témakörben eddig elvégzett kísérletek nagy részében 1 órás gyógyszer inkubációs időt alkalmaztak. Shields és munkatársai azonban bebizonyították, hogy a nagyon rövid CAS expozíciós idő (5-15 perc) is jelentős PAFE-t eredményez RPMI-1640-ben [Shields és mtsai. 2011].

Ezek az eredmények összhangban vannak egy korábban publikált tanulmánnyal. Ernst és munkatársai 2000-ben publikált vizsgálataikban MIC fölötti CAS koncentrációkat alkalmazva 15 és 30 perces gyógyszer expozíciós időket használva >12 órás PAFE-t detektáltak normál RPMI-1640-ben.

C. albicans-szal végzett idő-ölés, illetve PAFE kísérleteinkben a gombasejtszám csökkenés hasonló volt RPMI-1640-ben. Fontos azonban kiemelni, hogy a 16 és 32 mg/L CAS koncentráción csökkent az ölési ráta mértéke normál RPMI-1640-ben, ami valószínűsíthetően a magas echinocandin koncentráción, izolátumfüggő módon megfigyelhető kompenzatórikus kitinszintézis eredménye (paradox növekedés) [Cantón és mtsai. 2010; Walker és mtsai. 2013].

A PAFE kísérleteinkben mindhárom vizsgált CAS koncentráción (4, 16 és 32 mg/L) szignifikánsan csökkent az ölési ráta 50% szérumban jelenlétében a normál RPMI-1640-ben kapott értékekkel összehasonlítva. Ezzel ellentétben, a folyamatos 24 órás CAS expozíciót jelentő idő-ölés kísérletekben ≥ 1 mg/L-es koncentrációkon nagy, koncentráció független módon fennálló ölési rátát detektáltunk.

Előkísérleteink alapján 0,5-2 mg/L-es CAS koncentrációkat vizsgálva az 1 órás gyógyszer expozíció 50% humán szérumban jelenlétében nem elég hosszú ahhoz, hogy akár kismértékű növekedés gátlást eredményezzen, ellentétben az RPMI-1640-ben kapott eredményekkel.

Louie és munkatársai 2005-ben publikált eredményei alapján a szövetek egyfajta gyógyszer rezervoárként szolgálnak, melyekből lassú, folyamatos CAS felszabadulás történik a vérbe. Ez magyarázza a majdnem háromszoros különbséget a szérumban lévő gyógyszer, valamint a szövetekben és szérumban együttesen jelenlévő CAS terminális féléletideje között.

Eredményeik azt jelzik, hogy a CAS kiváló *in vivo* aktivitásáért inkább a „szöveti rezervoár” jelenség a felelős, mint a PAFE [Louie és mtsai. 2005].

A Louie és munkatársai által kapott eredmények összhangban vannak a kísérleteinkben tapasztaltakkal, ugyanis 50% humán szérum jelenlétében az 1 órás CAS expozíció minden esetben negatív *k* értékeket eredményezett, ami a gombasejtek növekedését jelentette. *In vitro* eredményeink alapján 50% szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben a PAFE megszűnik, annak ellenére, hogy korábban a szérummentes tápközegben már 5 perc CAS expozíció is jelentős PAFE-t eredményezett [Shields és mtsai. 2011]. Az 50% szérum jelenlétében megfigyelt elhanyagolható PAFE azt jelenti, hogy az *in vitro* RPMI-1640-ben tapasztalt relatíve hosszú PAFE kevésbé játszik kulcsszerepet a klinikai kimenetel szempontjából, legalábbis a *C. albicans* ellen.

A jövőben további vizsgálatok szükségesek annak kiderítése érdekében, hogy más klinikailag releváns *Candida* fajok esetében lehet-e bármilyen klinikai relevanciája az echinocandinok által kifejtett PAFE-nak.

Cantón és munkatársai 2004-ben vizsgálták a korábban „gold standard” AMB által kiváltott ölési rátát különböző *Candida* fajok, köztük a FLU rezisztens *C. krusei* ellen. Ebben a kísérletben a maximális ölési rátát 2 mg/L-nél érték el, amely alig emelkedett magasabb AMB koncentrációk esetében. A lassú ölési aktivitással magyarázható az AMB-vel kezelt *C. krusei* okozta fertőzések során tapasztalt csökkent klinikai hatékonyság [Cantón és mtsai. 2004].

Cantón és munkatársai 2009-es tanulmányukban a három echinocandin (CAS, MICA, ANI) *in vitro* aktivitását vizsgálta *C. krusei* klinikai izolátumok ellen normál RPMI-1640-ben. Az általuk vizsgált törzsek MIC értéke 0,5-2 mg/L között volt. Vizsgálataikban az első 6 óra alatt az egyes gyógyszerek ölési aktivitása izolátumfüggő, de koncentráció független volt, tehát az ölési ráta nem nőtt jelentősen az adott gyógyszer koncentrációjának növelésével. Hat óra után koncentrációtól függően ölés vagy újránövekedés volt megfigyelhető. Általánosságban elmondható, hogy az ölési aktivitás az adott *C. krusei* törzs MIC értékénél kezdődött, és a három nagyságrendnyi csíraszámcsökkenést a kiindulási sejtszámhoz képest (fungicid határ) $\geq 0,5$ mg/L koncentráción 19,1-20,7 óra alatt érték el ANI és 25,9-31,8 óra alatt MICA esetében. A CAS vizsgálata során 2 mg/L-es koncentráción 37,4 óra, 8 mg/L-nél 29,2 óra, míg 32 mg/L CAS koncentráció jelenlétében 21,4 óra alatt érték el a fungicid határt normál RPMI-1640-ben. Ezenkívül fontos kiemelni, hogy kísérleteikben az ANI mutatta a legnagyobb ölési aktivitást a vizsgált *C. krusei* izolátumok ellen. [Cantón és mtsai. 2009].

Kísérleteinkben a Cantón és munkatársai által kapott adatokhoz képest alacsonyabb értékeket kaptunk RPMI-1640-ben. Nyolc mg/L CAS koncentráción 4,2 óra, míg 32 mg/L-es

gyógyszerkoncentráción 4,64 óra alatt érték el a fungicid határt, azonban a kísérleteinkben használt *C. krusei* klinikai izolátumok MIC értéke jóval alacsonyabb volt (0,25 mg/L) a Cantón és munkatársai által használt törzsekkel összehasonlítva.

Szérum jelenlétében jelentős (4-8-szoros) MIC érték emelkedést tapasztaltunk a vizsgált *C. krusei* izolátumok esetében. Az ölési ráta a hatékony CAS koncentrációkon (4-32 mg/L) koncentráció független volt a *C. krusei* klinikai izolátumok vizsgálata során. Ez azt jelenti, hogy miután elérjük a hatékony CAS koncentrációt, további koncentráció növelés már csak kismértékben, de nem szignifikánsan befolyásolja az eredményt. Szérum jelenlétében az RPMI-1640-ben tapasztalt fungicid hatáshoz szükséges idő 8 mg/L-nél 7,68 órára, míg 32 mg/L-es CAS koncentráción 7,42 órára növekedett.

A klinikai izolátumokkal ellentétben a *C. krusei* referencia törzs kissé különbözött, ami valószínűsíthetően az eltérő eredetnek köszönhető. Míg a vizsgálatainkban használt izolátumok vérből származtak addig az ATCC 6258-as tesztörzs köpetből származik.

In vitro eredményeinket sikerült neutropéniás egérmódelben is megerősíteni. Az *in vivo* vizsgálatainkban alkalmazott 1 mg/kg/nap megfelel 35 mg-os humán dózisnak, a 2 mg/kg/nap 50 mg-os naponta adagolt humán dózissal ekvivalens. A 3 és 5 mg/kg-os egérdózisok az AUC értékek alapján megfelelnek az egyszeri 70 mg majd napi 50 mg-os, valamint a napi 70 mg-os humán dózisokkal elért emberben mért AUC értékeknek [Stone és mtsai. 2002; Barchiesi és mtsai. 2006; Migoya és mtsai. 2011; Flattery és mtsai. 2011].

Mind az *in vitro* mind pedig az *in vivo* eredményeink azt mutatják, hogy a naponta alkalmazott nagyobb dózisú CAS adagolása nem eredményez olyan mértékű terápiás sikert, ami indokolná a nagyobb dózisok klinikai alkalmazását. Az echinocandin rezisztenciával rendelkező *C. krusei* törzsek ellen viszont hatékony lehet. Kísérleteinkben a DPL45-ös heterozigóta mutáns törzs ellen *in vivo* a legnagyobb vizsgált dózis (15 mg/kg/nap) szignifikánsan csökkentette a vesékből kitenyészett gombák számát a kontroll csoporttal összehasonlítva. Ez az AUC értékek alapján megfelel 150 mg-os humán napi dózisnak [Würthwein és mtsai. 2013].

Hasonló eredményt kaptak Wiederhold és munkatársai 2011-ben publikált munkájuk alapján. Kísérleteikben két rezisztens *C. albicans* törzs vizsgálata során az 53264-es izolátum esetében (Fks1p S645P) a >21 napos túlélés 80% volt a 10 mg/kg napi CAS dózis esetében, ami szignifikánsan magasabb, mint a kezeletlen kontroll egerek túlélési aránya ($P < 0,01$) [Wiederhold és mtsai. 2011].

Egy korábbi tanulmányban az emelkedett CAS MIC értékkel rendelkező *C. glabrata* izolátum ellen is hatékonynak mutatkozott a magasabb CAS, illetve ANI dózis (5-10 mg/kg/nap)

[Wiederhold és mtsai. 2007]. A rendelkezésre álló adatok alapján az emelt dózisú terápia létjogosultsága rezisztens izolátumok esetén egyelőre kétséges.

Érdekes módon a *C. inconspicua* a *C. krusei*-től eltérően viselkedett. Habár 50% szérum jelenlétében a CAS iránti MIC értékek négyszeres növekedést mutattak, a szérum jelenléte 1-32 mg/L-es CAS koncentrációkon fokozta az ölési rátát. Ez a jelenség nem egyedüli eset az irodalomban. Chiller és munkatársai hasonló eredményekről számoltak be 2000-ben publikált tanulmányukban. Kísérletükben *A. fumigatus* esetében vizsgálták a CAS *in vitro* hatékonyságát normál RPMI-1640-ben, illetve 0,05-5% szérum jelenlétében. A humán szérum 0,1 és 0,05 mg/L CAS koncentrációkon fokozta a CAS *in vitro* aktivitását. Előbbi esetben 78,6%-os, míg utóbbinál 58,3%-os gátlást tapasztaltak [Chiller és mtsai. 2000]. Wiederhold és munkatársai által elvégzett kísérletben 5% és 50% humán szérum használata kis mértékben szintén fokozta a CAS *in vitro* aktivitását *C. glabrata* izolátumok ellen. [Wiederhold és mtsai. 2007].

Kísérleteinkben a *C. inconspicua*-nál tapasztalt ölési aktivitás a *C. krusei*-hez hasonlóan koncentráció független volt, azonban 50% szérum jelenlétében már 1 mg/L koncentráción is pozitív *k* értéket kaptunk, ami a sejtek ölését jelentette. A *C. krusei* klinikai izolátumok esetében csak 4 mg/L CAS koncentrációtól tapasztaltunk ölést. További különbség, hogy a *C. inconspicua* klinikai izolátumok esetében az egyes koncentrációkon a >99,9%-os sejtszám csökkenéshez szükséges idő is rövidebb volt 1-32 mg/L CAS koncentrációk között (2,09-2,67 óra), összehasonlítva a *C. krusei* klinikai törzseknél kapott értékekkel.

Neutropéniás egérmodellben a vizsgált *C. krusei* klinikai törzsektől eltérően az összes általunk használt dozírozási stratégia (1-15 mg/kg/nap) szignifikánsan csökkentették a vesékből kinőtt élő gombasejtek számát a kontroll csoporttal összehasonlítva a vizsgált *C. inconspicua* törzsek ellen.

Eredményeink alapján a CAS, akár kis dózisban adagolva is hatékony lehet ezen ritkábban izolálható FLU rezisztens opportunistá gomba ellen.

Kísérleteinkben elsőként hasonlítottuk össze a CAS által kifejtett ölési rátát normál RPMI-1640-ben, illetve 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640-ben három klinikailag releváns *Candida* faj esetén. Szérumos tápközegben a folyamatos, 24 óráig fennálló CAS expozíció magas ölési rátát eredményezett a vizsgált *C. albicans* izolátumokkal szemben. Ezzel ellentétben, az 1 órás CAS expozíció nem eredményezett ölést a szérummal kiegészített tápközegben. Ezek alapján, az eddig leginkább elfogadott elméletekkel ellentétben, a CAS által (és valószínűleg a többi echinocandin által is) kifejtett PAFE-nak csak minimális szerepe lehet az echinocandinok kitűnő klinikai hatékonyságában.

Kísérleteink második szakaszában a vizsgált *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok CAS iránti MIC értéke jelentősen megnövekedett 50% szérumban jelenlétében. Szérumban az ölési ráta, a hatékony CAS koncentrációkon koncentráció független volt a *C. krusei* klinikai izolátumok vizsgálata során. A CAS ölési aktivitása szérumban kiegészített tápközegben koncentráció független és szignifikánsan magasabb volt a *C. inconspicua* izolátumok ellen, az RPMI-1640-ben mért értékekkel összehasonlítva.

In vitro és *in vivo* eredményeink alapján a dózis növelés nem biztos, hogy jobb terápiás hatást eredményez a jelenleg elfogadott dozírozási ajánlással összehasonlítva, ráadásul felesleges költségnövekedést is eredményezhet a két FLU rezisztens *Candida* faj ellen.

Az új évezred elején bevezetett antifungális szerek alkalmazása ellenére a *Candida* fajok által okozott mortalitás még napjainkban is fajtól függően 30-60% [Lass-Flörl 2009]. A szérumban kiegészített *in vitro*, illetve az *in vivo* farmakodinámiás vizsgálatok segíthetnek, hogy egy hatékonyabb echinocandin alapú terápiát lehessen alkalmazni a jövőben a különböző *Candida* fajok ellen, ezzel is csökkentve a modern kor egyik legveszélyesebb népegészségügyi problémáját.

A kísérletek során kapott új eredmények:

Nem tapasztaltunk ölési aktivitást az 1 órás CAS expozíciót modellező PAFE kísérletek folyamán 50% humán szérumban jelenlétében.

A hatékony koncentrációkon a CAS koncentráció-független aktivitást mutatott 50% humán szérumban jelenlétében a *C. krusei* klinikai izolátumok ellen.

A CAS ölési aktivitása szérumban tápközegben szignifikánsan magasabb volt a *C. inconspicua* izolátumok ellen

In vivo eredményeink alapján a dóziseszkaláció klinikai jelentősége megkérdőjelezhető *C. krusei* és a *C. inconspicua* esetében.

VII. Összefoglalás

A szisztémás *Candida* és *Aspergillus* fajok okozta infekciók incidenciája, a predisponáló tényezők nagy száma miatt az 1980-as évektől folyamatosan növekszik. A fluconazol használat eredményeképpen a *C. albicans* mellett egyre gyakrabban izolálják a primer fluconazol rezisztenciával rendelkező *C. krusei*, illetve *C. inconspicua* fajokat.

A 2000-es évek elején bevezetett caspofungin kedvező farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságai miatt sikeresen alkalmazható mind a *Candida*, mind az *Aspergillus* fajok okozta szisztémás infekciókban.

Munkánk során vizsgáltuk a caspofungin által kifejtett ölési rátát, valamint a posztantifungális hatás időtartamát normál RPMI-1640-ben és 50% humán szérummal kiegészített tápközegen *C. albicans* izolátumok ellen. Ugyancsak meghatároztuk a caspofungin által kifejtett ölési rátát a fentebb említett kétféle tápközegben *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok ellen. Végül különböző dózisokat (1, 2, 3, 5, 15 mg/kg/nap) alkalmazva vizsgáltuk a caspofungin *in vivo* hatékonyságát a *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok esetében neutropéniás egérmodellben.

A caspofungin nagyfokú fehérjekötődése miatt (96,5%) csökkent aktivitással bír a szérummal kiegészített tápközegben. Tesztmédiiumtól függetlenül mindkét közegben fungisztatikus hatást tapasztaltunk a *C. albicans* klinikai izolátumok és a referencia törzs esetében ($\geq 0,03$ mg/L RPMI-1640-ben, $\geq 0,25-0,5$ mg/L 50% szérum jelenlétében). Ezzel szemben a *C. krusei* és *C. inconspicua* klinikai törzsek vizsgálatakor fungicid hatást detektáltunk ($\geq 0,5-8$ RPMI-1640-ben, $\geq 0,5-16$ mg/L 50% szérum jelenlétében). A *C. albicans* vizsgálata során szérum jelenlétében az 1 órás caspofungin expozíció nem okozott ölést. Az ölési ráta vizsgálatokor, *C. albicans* esetén csak a folyamatos caspofungin expozíció eredményezett mérhető ölési rátát 50% szérumban, ezért valószínűsíthető, hogy a posztantifungális hatásnak minimális szerepe van a klinikai hatékonyság szempontjából. A *C. krusei* klinikai izolátumok esetében 50% szérumban koncentráció független ölést tapasztaltunk (4-32 mg/L). Szérumos tápközegben 1-32 mg/L tartományban koncentráció független és szignifikánsan nagyobb ölést figyeltünk meg a vizsgált *C. inconspicua* törzseknél az RPMI-1640-ben tapasztalt értékekkel összehasonlítva. *In vitro* és *in vivo* eredményeink alapján a dóziseszkáláció klinikai relevanciája megkérdőjelezhető a *C. krusei* és *C. inconspicua* klinikai izolátumok ellen.

VIII. Summary

The incidence of systemic fungal infections caused by *Candida* and *Aspergillus* species has been steadily increasing since 1980s due to large number of predisposing factors. Intrinsic fluconazole resistant species such as *C. krusei* and *C. inconspicua* are identified more frequently as a result of fluconazol consumption.

Owing to favorable pharmacokinetics and pharmacodynamics properties caspofungin introduced in the early 2000s demonstrates excellent activity both caused by *Candida* and *Aspergillus* systemic infections.

During our investigations killing rate exerted by caspofungin was determined as well as the extent of postantifungal effect in RPMI-1640 with and without 50% human serum against *C. albicans* isolates. Thereafter killing rate exerted by caspofungin was determined mentioned above two type of medium against *C. krusei* and *C. inconspicua* isolates. Finally, *in vivo* efficacy of caspofungin was investigated using different doses (1, 2, 3, 5, 15 mg/kg/day) against *C. krusei* and *C. inconspicua* strains in neutropenic mouse model.

Caspofungin possess with reduced activity in medium supplemented with serum due to the high degree of protein binding (96,5%). However, fungistatic activity was observed in both media in case of *C. albicans* clinical isolates and the reference strain ($\geq 0,03$ mg/L in RPMI-1640, $\geq 0,25-0,5$ mg/L in presence of 50% serum). In contrast, fungicid activity was detected during the examination of *C. krusei* and *C. inconspicua* ($\geq 0,5-8$ in RPMI-1640, $\geq 0,5-16$ mg/L in presence of 50% serum). One-hour caspofungin exposure did not cause killing in the presence of serum against *C. albicans* isolates. During the investigation of killing rate, continuous but not brief caspofungin exposure produced measurable killing rates against *C. albicans* clinical isolates in killing studies in the presence of 50% serum, consequently postantifungal effect may play a limited role in the excellent clinical efficacy of caspofungin. The killing rate at effective caspofungin concentrations (4-32 mg/L) was concentration independent in serum against *C. krusei* clinical isolates.

Significantly higher and concentration independent killing was observed at 1-32 mg/L concentrations in the presence of 50% human serum against *C. inconspicua* strains in comparison with values in RPMI-1640. On the basis of our *in vitro* and *in vivo* findings the clinical relevance of caspofungin dose escalation against *C. krusei* and *C. inconspicua* is questionable.

IX. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Majoros Lászlónak, aki felkeltette érdeklődésemet az orvosi mikrobiológia ezen ágazata iránt. Hasznos tanácsaival, útmutatásával segítségemre volt és munkámat mindig, minden körülmények között segítette és támogatta. Továbbá szeretném megköszönni Neki a rendszeres csütörtöki értekezleteket, amelyek nagyban elősegítették a kísérletek gördülékeny elvégzését.

Köszönöm Dr. Kónya Józsefnek, hogy az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben lehetővé tette számomra a Ph.D. elvégzését, valamint a kísérletes munkát.

Külön köszönetemet szeretném kinyilvánítani Dr. Földi Richárd, Dr. Szilágyi Judit, Domán Marianna és Berényi Réka korábbi, illetve jelenlegi Ph.D. hallgatóknak nélkülözhetetlen munkájukért és segítségükért.

Köszönet illeti Dr. David S. Perlin-t a Public Health Research Institute, New Jersey Medical School-Ruthgers professzorát, aki rendelkezésünkre bocsájtotta a kísérleteinkben felhasznált echinocandin rezisztens izolátumokat.

Köszönöm Orosz-Tóth Katalin áldozatos munkáját, aki az egerek oltásában nagy segítségünkre volt.

Köszönet illeti az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársát, hogy segítő munkájukkal lehetővé tették kutatásaimat és Ph.D. értekezésem megírását.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak és Menyasszonyomnak, akik lehetővé tették egyetemi tanulmányaimat és ösztönző magatartásukkal, támogatásukkal mindvégig stabil háttérrel nyújtottak nekem, és persze külön köszönet barátaimnak támogatásukért, hasznos tanácsaikért, valamint a jó hangulatú kávézásokért.

X. Irodalomjegyzék

Abe F, Ueyama J, Kawasumi N, Nadai M, Hayashi T, Kato M, Ohnishi M, Saito H, Takeyama N, Hasegawa T. Role of plasma proteins in pharmacokinetics of micafungin, an antifungal antibiotic, in analbuminemic rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008, 52(9):3454-6.

Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Bohrmuller J, Marchillo K, Lepak A. *In vivo* comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, 54(6):2497-506.

Andes D. Optimizing antifungal choice and administration. *Curr Med Res Opin.* 2013, 29 Suppl 4:13-8.

Andes D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. *Infect Dis Clin North Am.* 2006, 20(3):679-97.

Apisarnthanarak A, Naknarongkij N, Kiratisin P, Mundy LM. Risk factors and outcomes of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species at a Thai tertiary care center. *Am J Infect Control.* 2009, 37(9):781-2.

Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fuursted K, Johansen HK, Kjaeldgaard P, Knudsen JD, Kristensen L, Møller J, Nielsen L, Rosenvinge FS, Røder B, Schønheyder HC, Thomsen MK, Truberg K. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol.* 2011, 49(1):325-34.

Baily GG, Moore CB, Essayag SM, de Wit S, Burnie JP, Denning DW. *Candida inconspicua*, a fluconazole-resistant pathogen in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 1997, 25(1):161-3.

Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Della Vittoria A, Arzeni D, Manso E, Scalise G. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006, 50(8):2719-27.

Bartizal K, Gill CJ, Abruzzo GK, Flattery AM, Kong L, Scott PM, Smith JG, Leighton CE, Bouffard A, Dropinski JF, Balkovec J. *In vitro* preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob Agents Chemother.* 1997, 41(11):2326-32.

Ben-Ami R, Garcia-Effron G, Lewis RE, Gamarra S, Leventakos K, Perlin DS, Kontoyiannis DP. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *J Infect Dis.* 2011, 204(4):626-35.

Betts RF, Nucci M, Talwar D, Gareca M, Queiroz-Telles F, Bedimo RJ, Herbrecht R, Ruiz-Palacios G, Young JA, Baddley JW, Strohmaier KM, Tucker KA, Taylor AF, Kartsonis NA; Caspofungin High-Dose Study Group. A Multicenter, double-blind trial of a high-dose caspofungin treatment regimen versus a standard caspofungin treatment regimen for adult patients with invasive candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 2009, 48:1676-1684.

Beyda ND, Lewis RE, Garey KW. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Ann Pharmacother.* 2012, 46(7-8):1086-96.

Bizerra FC, Melo AS, Katchburian E, Freymüller E, Straus AH, Takahashi HK, Colombo AL. Changes in cell wall synthesis and ultrastructure during paradoxical growth effect of caspofungin on four different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(1):302-10.

Brown AJ. Morphogenetic signaling pathways in *Candida albicans*. In *Candida and Candidiasis*. Edited by Calderone RA. Washington, DC ASM Press, 2002, 95-106.

Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J, del Castillo L. *In vitro* fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, 54(5):2194-7.

Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48(7):2477-82.

Cantón E, Pemán J, Valentín A, Espinel-Ingroff A, Gobernado M. *In vitro* activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009, 53(7):3108-11.

Cassone A. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. *Curr Top Med Mycol.* 1989, 3:248-314.

Castanheira M, Woosley LN, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN, Pfaller MA. Low prevalence of fks1 hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, 54(6):2655-9.

Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998, 62(1):130-80.

Chamilos G, Lewis RE, Albert N, Kontoyiannis DP. Paradoxical effect of Echinocandins across *Candida* species *in vitro*: evidence for echinocandin-specific and candida species-related differences. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51(6):2257-9.

Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs.* 2011, 71(1):11-41.

Chiller T, Farrokshad K, Brummer E, Stevens DA. Influence of human sera on the *in vitro* activity of the echinocandin caspofungin (MK-0991) against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000, 44(12):3302-5.

Clancy CJ, Huang H, Cheng S, Derendorf H, Nguyen MH. Characterizing the effects of caspofungin on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida glabrata* isolates by simultaneous time-kill and postantifungal-effect experiments. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006, 50(7):2569-72.

Clark TA, Hajjeh RA. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr Opin Infect Dis.* 2002, 15(6):569-74.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts (Third informational supplement). CLSI Document M27-S3 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008/a

Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. Approved standard-third edition M27-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2008/b

Cornely OA, Vehreschild JJ, Vehreschild MJ, Würthwein G, Arenz D, Schwartz S, Heussel CP, Silling G, Mahne M, Franklin J, Harnischmacher U, Wilkens A, Farowski F, Karthaus M, Lehrnbecher T, Ullmann AJ, Hallek M, Groll AH. Phase II dose escalation study of caspofungin for invasive Aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(12):5798-803.

Del Poeta M, Cruz MC, Cardenas ME, Perfect JR, Heitman J. Synergistic antifungal activities of bafilomycin A(1), fluconazole, and the pneumocandin MK-0991/caspofungin acetate (L-743,873) with calcineurin inhibitors FK506 and L-685,818 against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000, 44(3):739-46.

Delaloye J, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence* 2014, 5(1):154-162.

Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 2003, 362(9390):1142-51.

Di Bonaventura G, Spedicato I, Picciani C, D'Antonio D, Piccolomini R. *In vitro* pharmacodynamic characteristics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole against bloodstream isolates of infrequent *Candida* species from patients with hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48(11):4453-6.

Dóczy I, Mestyán G, Puskás E, Nikolova R, Barcs I, Nagy E. Use of the BIOMIC Video System to evaluate the susceptibility of clinical yeast isolates to fluconazole and voriconazole by a disk diffusion method. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2006, 53(2):135-44.

Dutcher JD. The discovery and development of amphotericin B. *Dis Chest.* 1968, 54(Suppl 1):296-8.

Ernst EJ, Klepser ME, Pfaller MA. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000, 44(4):1108-11.

Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog*. 2012, 8(4):e1002585.

Flattery AM, Hickey E, Gill CJ, Powles MA, Misura AS, Galgoci AM, Ellis JD, Zhang R, Sandhu P, Ronan J, Abruzzo GK. Efficacy of caspofungin in a juvenile mouse model of central nervous system candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011, 55(7):3491-7.

Fleischhacker M, Radecke C, Schulz B, Ruhnke M. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008, 27(2):127-31.

Földi R, Kovács R, Gesztelyi R, Kardos G, Berényi R, Juhász B, Szilágyi J, Mózes J, Majoros L. Comparison of *in vitro* and *in vivo* efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. *Mycopathologia*. 2012/a, 174(4):311-8.

Földi R, Szilágyi J, Kardos G, Berényi R, Kovács R, Majoros L. Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012/b, 73(4):338-42.

Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect*. 2008, 56(2):126-9.

Fridkin SK. Candidemia is costly--plain and simple. *Clin Infect Dis*. 2005, 41(9):1240-1.

García MT, Llorente MT, Mínguez F, Prieto J. Postantifungal effect and effects of sub-MIC concentrations on previously treated *Candida* sp. influence of growth phase. *J Infect*. 2002, 45(4):263-7.

Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008, 52(7):2305-12.

Garcia-Effron G, Lee S, Park S, Cleary JD, Perlin DS. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009/a, 53(9):3690-9.

Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of fks1 mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009/b, 53(1):112-22.

Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. Improved detection of *Candida* sp. fks hot spot mutants by using the method of the CLSI M27-A3 document with the addition of bovine serum albumin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(5):2245-55.

Gauthier GM, Nork TM, Prince R, Andes D. Subtherapeutic ocular penetration of caspofungin and associated treatment failure in *Candida albicans* endophthalmitis. *Clin Infect Dis.* 2005, 41(3):e27-8.

Gergely Lajos: Orvosi mikrobiológia. 2003. Alliter Kiadói és Oktatásfejlesztő Alapítvány. Budapest.

Ghannoum MA, Perfect JR. *Antifungal therapy*, informa healthcare, 2010.

Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2011, 10(2):112-22.

Guitard J, Angoulvant A, Letscher-Bru V, L'Ollivier C, Cornet M, Dalle F, Grenouillet F, Lacroix C, Vekhoff A, Maury E, Caillot D, Charles PE, Pili-Floury S, Herbrecht R, Raffoux E, Brethon B, Hennequin C. Invasive infections due to *Candida norvegensis* and *Candida inconspicua*: report of 12 cases and review of the literature. *Med Mycol.* 2013, 51(8):795-9.

Howlett JA. The infection of rat tongue mucosa *in vitro* with five species of *Candida*. *J Med Microbiol.* 1975, 9:309-316.

Ishikawa J, Maeda T, Matsumura I, Yasumi M, Ujiie H, Masaie H, Nakazawa T, Mochizuki N, Kishino S, Kanakura Y. Antifungal activity of micafungin in serum. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009, 53(10):4559-62.

Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. ISRN Microbiol. 2012, 2012:538694.

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time kill-curve results: proposal for standardized methods. Antimicrob. Agents Chemother. 1998, 42:1207-1212.

Kofla G, Ruhnke M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis: review of the literature. Eur J Med Res. 2011,16(4):159-66.

Kondoh O, Tachibana Y, Ohya Y, Arisawa M, Watanabe T. Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis. J Bacteriol. 1997, 179(24):7734-41.

Kontoyiannis DP, Luna MA, Samuels BI, Bodey GP. Hepatosplenic candidiasis. A manifestation of chronic disseminated candidiasis. Infect Dis Clin North Am. 2000, 14(3):721-39.

Kontoyiannis DP. Invasive mycoses: strategies for effective management. Am J Med. 2012, 125(1 Suppl):S25-38.

Kuhn DM, Ghannoum MA. *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. Curr Opin Investig Drugs. 2004, 5(2):186-97.

Kurtz MB, Abruzzo G, Flattery A, Bartizal K, Marrinan JA, Li W, Milligan J, Nollstadt K, Douglas CM. Characterization of echinocandin-resistant mutants of *Candida albicans*: genetic, biochemical, and virulence studies. Infect Immun. 1996, 64(8):3244-51.

Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 2009, 52(3):197-205.

Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology. Mayo Clin Proc. 2011, 86(8):805-17.

Lewis RE. Pharmacodynamic implications for use of antifungal agents. Curr Opin Pharmacol. 2007, 7(5):491-7.

Lipp HP. Antifungal agents--clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Mycoses*. 2008, 51 Suppl 1:7-18.

Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, Baughman W, Stein B, Hollick R, Park BJ, Chiller T. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol*. 2012, 50(11):3435-42.

López-Martínez R. Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol*. 2010, 28(2):178-84

Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F; French Mycosis Study Group. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011, 55(2):532-8.

Louie A, Deziel M, Liu W, Drusano MF, Gumbo T, Drusano GL. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of systemic candidiasis: importance of persistence of caspofungin in tissues to understanding drug activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005, 49(12):5058-68.

Majoros L, Kardos G, Belák A, Maráz A, Asztalos L, Csánky E, Barta Z, Szabó B. Restriction enzyme analysis of ribosomal DNA shows that *Candida inconspicua* clinical isolates can be misidentified as *Candida norvegensis* with traditional diagnostic procedures. *J Clin Microbiol*. 2003, 41(11):5250-3.

Majoros L, Kardos G, Pócsi I, Szabó B. Distribution and susceptibility of *Candida* species isolated in the Medical University of Debrecen. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2002, (2-3):351-61.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003, 348(16):1546-54.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013, 4(2):119-28.

McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, Warnock DW. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis.* 2001, 33(5):641-7.

Méan M, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care.* 2008, 12(1):204.

Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.* 2011, 11(2):142-51.

Migoya EM, Mistry GC, Stone JA, Comisar W, Sun P, Norcross A, Bi S, Winchell GA, Ghosh K, Uemera N, Deutsch PJ, Wagner JA. Safety and pharmacokinetics of higher doses of caspofungin in healthy adult participants. *J. Clin. Pharmacol.* 2011, 51:202-211.

Mitchell AP. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 1998, 1(6):687-92.

Molano J, Bowers B, Cabib E. Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *J Cell Biol.* 1980, 85(2):199-212.

Moran, G. P., D. J. Sullivan, and D. C. Coleman. Emergence of non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogens. 2002, p. 37–54. In R. A. Calderone (ed.), *Candida* and candidiasis. ASM Press, Washinton, DC.

Mukherjee PK, Sheehan D, Puzniak L, Schlamm H, Ghannoum MA. Echinocandins: are they all the same? *J Chemother.* 2011, 23(6):319-25.

Murciano C, Moyes DL, Runglall M, Tobouti P, Islam A, Hoyer LL, Naglik JR. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. *PLoS One.* 2012, 7(3):e33362

Nasar A, Ryan L, Frei CR, Cota JM, Wiederhold NP. Influence of serum and albumin on echinocandin *in vitro* potency and pharmacodynamics. *Curr Fungal Infect Rep.* 2013, 7(2):89-95.

Nguyen KT, Ta P, Hoang BT, Cheng S, Hao B, Nguyen MH, Clancy CJ. Anidulafungin is fungicidal and exerts a variety of postantifungal effects against *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009, 53(8):3347-52.

Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, Mitchell AP. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol*. 2008, 18(14):1017-24.

Odabasi Z, Paetznick V, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. Effects of serum on *in vitro* susceptibility testing of echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007, 51(11):4214-6.

Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol*. 1994, 31(3 Pt 2):S2-5.

Paderu P, Garcia-Effron G, Balashov S, Delmas G, Park S, Perlin DS. Serum differentially alters the antifungal properties of echinocandin drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007, 51(6):2253-6.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD; Infectious Diseases Society of America. Clinical Practice Guidelines for the management of candidiasis: Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis*. 2009, 48:503-535.

Pappas PG, Rotstein CM, Betts RF, Nucci M, Talwar D, De Waele JJ, Vazquez JA, Dupont BF, Horn DL, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Suh B, Digumarti R, Wu C, Kovanda LL, Arnold LJ, Buell DN. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2007, 45(7):883-93

Park S, Kelly R, Kahn JN, Robles J, Hsu MJ, Register E, Li W, Vyas V, Fan H, Abruzzo G, Flattery A, Gill C, Chrebet G, Parent SA, Kurtz M, Teppler H, Douglas CM, Perlin DS. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005, 49(8):3264-73.

Parra-Ortega B, Cruz-Torres H, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009, 104(3):505-12.

Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat*. 2007, 10(3):121-30.

Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology* 2007, 45(4):321-346.

Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing: Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist. Updat.* 2010/a, 13:180-95.

Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, Motyl M, Perlin DS, CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist. Updat.* 2011, 14:164-176.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA, Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* 2010/c, 48(4):1366-77.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, Rinaldi M, Barton R, Veselov A; Global Antifungal Surveillance Group. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol.* 2008/a, 46(2):515-21.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, Finkelievich J, Barnes R, Wadula J; Global Antifungal Surveillance Group. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J. Clin. Microbiol.* 2008/b, 46(3): 842-9.

Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Alexander BD, Andes D, Brown SD, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Knapp CC, Sheehan DJ, Walsh TJ. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J. Clin. Microbiol.* 2008/c, 46(8): 2620-9.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007, 20(1):133-63.

Pfaller MA, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012/a, 74(4):323-31.

Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am. J. Med.* 2012/b, 125(1):S3-13.

Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Ibrahim AS, Edwards JE Jr, Filler SG. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol.* 2007, 5(3):e64.

Pound MW, Townsend ML, Drew RH. Echinocandin pharmacodynamics: review and clinical implications. *J Antimicrob Chemother.* 2010, 65(6):1108-18.

Remold H, Fasold H, Staib F. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta.* 1968, 167(2):399-406.

Rex JH, Bennett JE, Sugar AM, Pappas PG, van der Horst CM, Edwards JE, Washburn RG, Scheld WM, Karchmer AW, Dine AP. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N. Engl. J. Med.* 1994, 331(20):1325–1330.

Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, Edwards JE. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2000, 30(4):662-78.

Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother.* 2005, 56(Suppl. S1):i5-i11.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol.* 1994, 41(5):295-310.

Sanglard D, Hube B, Monod M, Odds FC, Gow NA. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun*. 1997, 65(9):3539-46.

Schäfer-Korting M, Korting HC, Rittler W, Obermüller W. Influence of serum protein binding on the in vitro activity of anti-fungal agents. *Infection*. 1995, 23(5):292-7.

Shields RK, Nguyen MH, Du C, Press E, Cheng S, Clancy CJ. Paradoxical effect of caspofungin against *Candida* bloodstream isolates is mediated by multiple pathways but eliminated in human serum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011, 55(6):2641-7.

Silva NC, Nery JM, Dias AL. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. *Mycoses*. 2014, 57(1):1-11.

Simon J, Sun HY, Leong HN, Barez MY, Huang PY, Talwar D, Wang JH, Mansor M, Wahjuprajitno B, Patel A, Wittayachanyapong S, Sany BS, Lin SF, Dimopoulos G. Echinocandins in invasive candidiasis. *Mycoses*. 2013, 56(6):601-9.

Sims CR, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch Med Res*. 2005, 36(6):660-71.

Sirohi B, Powles RL, Chopra R, Russell N, Byrne JL, Prentice HG, Potter M, Koblinger S. A study to determine the safety profile and maximum tolerated dose of micafungin (FK463) in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006, 38(1):47-51.

Sobel JD, Kauffman CA, McKinsey D, Zervos M, Vazquez JA, Karchmer AW, Lee J, Thomas C, Panzer H, Dismukes WE. Candiduria: a randomized, double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis*. 2000, 30(1):19-24.

Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. 2007, 369(9577):1961-71.

Staib F. Metabolism of human serum proteins by strains of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol Mycol Appl*. 1965, 26(2):209-24.

Staib P, Morschhäuser J. Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses*. 2007, 50(1):1-12.

Stevens DA, Espiritu M, Parmar R. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48(9):3407-11.

Stevens DA, Ichinomiya M, Koshi Y, Horiuchi H. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006, 50(9):3160-1.

Stone JA, Holland SD, Wickersham PJ, Sterrett A, Schwartz M, Bonfiglio C, Hesney M, Winchell GA, Deutsch PJ, Greenberg H, Hunt TL, Waldman SA. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002, 46(3):739-45.

Stone JA, Xu X, Winchell GA, Deutsch PJ, Pearson PG, Migoya EM, Mistry GC, Xi L, Miller A, Sandhu P, Singh R, deLuna F, Dilzer SC, Lasseter KC. Disposition of caspofungin: role of distribution in determining pharmacokinetics in plasma. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48(3):815-23.

Sugita T, Takeo K, Ohkusu M, Virtudazo E, Takashima M, Asako E, Ohshima F, Harada S, Yanaka C, Nishikawa A, Majoros L, Sipiczki M. Fluconazole-resistant pathogens *Candida inconspicua* and *C. norvegensis*: DNA sequence diversity of the rRNA intergenic spacer region, antifungal drug susceptibility, and extracellular enzyme production. *Microbiol Immunol.* 2004, 48(10):761-6.

Szalka András, Tímár László, Ludwig Endre, Mészner Zsófia. *Infektológia.* 2005. Medicina könyvkiadó Rt. Budapest.

Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, Goto T, Tomishima M, Ohki H, Yamada A, Kawabata K, Takasugi H, Sakane K, Tanaka H, Matsumoto F, Kuwahara S. *In vitro* activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000, 44(1):57-62.

Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell.* 2011, 10(9):1173-82.

Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect.* 2006, 12(5):418-25.

van Burik JH, Leisenring W, Myerson D, Hackman RC, Shulman HM, Sale GE, Bowden RA, McDonald GB. The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal diseases in bone marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 355 patients. *Medicine (Baltimore).* 1998, 77(4):246-54.

Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol.* 2006, 60(1):5-15.

Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M, Wilson D, Hube B. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One.* 2012, 7(5):e36952.

Walker LA, Gow NA, Munro CA. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013, 57(1):146-54.

Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2007, 48(1):1-12.

Wiederhold NP, Kontoyiannis DP, Chi J, Prince RA, Tam VH, Lewis RE. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis: evidence of concentration-dependent activity. *J Infect Dis.* 2004, 190(8):1464-71.

Wiederhold NP, Lewis RE. The echinocandin antifungals: an overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy. *Expert Opin Investig Drugs.* 2003, 12(8):1313-33.

Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra R, Molina D, Olivo M, Graybill JR. *In vivo* efficacy of anidulafungin and caspofungin against *Candida glabrata* and association with *in vitro* potency in the presence of sera. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51(5):1616-20.

Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra RA, Kirkpatrick WR, Patterson TF. Caspofungin dose escalation for invasive candidiasis due to resistant *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(7):3254-60.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 39(3):309–317.

Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents.* 2014, 43(1):78-81.

Würthwein G, Cornely OA, Trame MN, Vehreschild JJ, Vehreschild MJ, Farowski F, Müller C, Boos J, Hempel G, Hallek M, Groll AH. Population pharmacokinetics of escalating doses of caspofungin in a phase II study of patients with invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013, 57(4):1664-71.

XI. Tárgyszavak-Keywords

echinocandinok, szérumbázisú érzékenységhatározás, posztantifungális hatás, időölés kísérletek, egér, *Candida* fajok, humán szérumbázis

echinocandins, serum-based susceptibility testing, postantifungal effect, time-kill experiments, mouse, *Candida* species, human serum

XII. Függelék



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/190/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

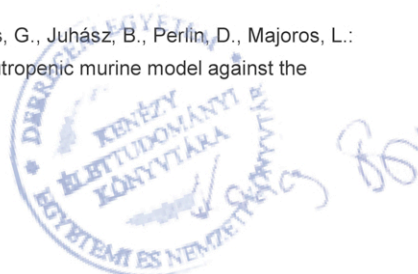
Jelölt: Kovács Renátó László
Neptun kód: HEOGB8
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Mtmt azonosító: 10036819

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, R.**, Gesztelyi, R., Perlin, D.S., Kardos, G., Domán, M., Berényi, R., Majoros, L.: Killing rates for caspofungin against *Candida albicans* after brief and continuous caspofungin exposure in the presence and absence of serum.
Mycopathologia. "accepted by publisher" (2014)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-014-9799-4>
IF:1.545 (2013)
2. **Kovács, R.**, Gesztelyi, R., Berényi, R., Domán, M., Kardos, G., Juhász, B., Majoros, L.: Killing rates exerted by caspofungin in 50 % serum and its correlation with in vivo efficacy in a neutropenic murine model against *Candida krusei* and *Candida inconspicua*.
J. Med. Microbiol. 63 (2), 186-194, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.066381-0>
IF:2.266 (2013)

További Közlemények

3. Berényi, R., **Kovács, R.**, Domán, M., Gesztelyi, R., Kardos, G., Juhász, B., Perlin, D., Majoros, L.: Efficacy of single large doses of caspofungin in a neutropenic murine model against the "psilosis" group.
New Microbiol. 37 (3), 355-362, 2014.
IF:1.603 (2013)



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu



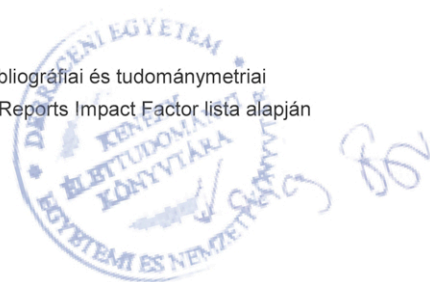
4. **Kovács, R.**, Czudar, A., Horváth, L., Szakács, L., Majoros, L., Kónya, J.: Serum interleukin-6 levels in murine models of *Candida albicans* infection.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 61 (1), 61-69, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.1.6>.
IF:0.78 (2013)
5. Földi, R., **Kovács, R.**, Gesztelyi, R., Kardos, G., Berényi, R., Juhász, B., Szilágyi, J., Mózes, J., Majoros, L.: Comparison of In Vitro and Vivo Efficacy of Caspofungin Against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*.
Mycopathologia. 174 (4), 311-318, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-012-9554-7>
IF:1.489
6. Földi, R., Szilágyi, J., Kardos, G., Berényi, R., **Kovács, R.**, Majoros, L.: Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology.
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 73 (4), 338-342, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.011>
IF:2.26
7. Bayegan, S., Majoros, L., Kardos, G., Kemény-Beke, Á., Miszti, C., **Kovács, R.**, Gesztelyi, R.: In vivo studies with a *Candida tropicalis* isolate exhibiting paradoxical growth in vitro in the presence of high concentration of caspofungin.
J. Microbiol. 48 (2), 170-173, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-010-9221-y>
IF:1.266

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11.209

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
3.811

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.08.13



Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek listája

R. Kovács, R. Gesztelyi, R. Berényi, M. Domán, G. Kardos, B. Juhász, L. Majoros Should echinocandin doses be increased against *Candida* species? An in vitro and in vivo study of caspofungin against *Candida albicans*, *C. krusei* and *C. inconspicua*. 6th Trends in Medical Mycology, 11-14 October 2013. Copenhagen, Denmark (P011) Mycoses

L. Majoros, **R. Kovács**, R. Berényi, M. Domán, C. Miszti and G. Kardos Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against *C. dubliniensis*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii* and *C. kefyr* using time-kill methodology. 6th Trends in Medical Mycology, 11-14 October 2013. Copenhagen, Denmark (P021) Mycoses

Berényi Réka, Földi Richárd, Szilágyi Judit, Kardos Gábor, **Kovács Renátó**, Majoros László: A micafungin antifungális hatása 50% humán szérumban nyolc *Candida* faj ellen az idő-ölésgörbék felvétele esetében. V. Magyar Mikológiai Konferencia 2012. május 23-25. Budapest Magyarország

R. Földi, J. Szilágyi, **R. Kovács**, R. Berényi, G. Kardos, L. Majoros Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology. 2nd workshop Medical Mycology: From basic science to clinical needs. December 8-10. 2011, Vienna, Austria (poster: PP-13)

L. Majoros, **R. Kovács**, R. Berényi, J. Szilágyi, R. Földi, R. Gesztelyi, G. Kardos, B. Juhász In vitro and in vivo efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. 2nd workshop Medical Mycology: From basic science to clinical needs. December 8-10. 2011, Vienna, Austria (poster: S6-02)

Bayegan S, Szilágyi J, Gesztelyi R, Kardos G, Mózes J, Kemény-Beke Á, Szabó Z, **Kovács R**, Majoros L. Correlation between postantifungal effect and the efficacy of the single 5 and 10 mg/kg caspofungin doses for treatment of disseminated candidiasis caused by *Candida krusei* in a neutropenic mouse model. 2nd Central European Forum for Microbiology (CEFOM). October 7-9. 2009, Keszthely, Hungary (poster: MP 19). Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (56) Suppl.2 126. o.

Fontosabb előadások listája

Kovács Renátó, Berényi Réka, Domán Marianna, Majoros László

A caspofungin in vitro hatékonyságának vizsgálata *Candida krusei*, *C. inconspicua* és *C. albicans* klinikai izolátumok ellen

Tavaszi Szél Konferencia, 2013 május 31-június 2. Sopron

Kovács Renátó, Berényi Réka, Földi Richárd, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor, Juhász Béla, Majoros László

In vitro and *vivo* efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*

Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi nagygyűlése, 2012. október 24-26. Keszthely Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (60)Suppl.1 38. o.

Berényi Réka Renáta, **Kovács Renátó**, Földi Richárd, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor, Juhász Béla, Majoros László

In vitro and *in vivo* efficacy of caspofungin against fluconazole resistant *Candida krusei* and *C. inconspicua* clinical isolate

Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi nagygyűlése, 2012 október 24-26. Keszthely Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (60)Suppl.1 7-8. o.

Kovács Renátó, Majoros László, Berényi Réka, Szilágyi Judit, Földi Richárd, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor és Juhász Béla: Caspofungin *in vivo* és *in vitro* hatékonyságának összehasonlító vizsgálata *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* és *C. albicans* izolátumok esetén

V. Magyar Mikológiai Konferencia 2012. május 23-25. Budapest

László Majoros, **Renátó Kovács**, Réka Berényi, Judit Szilágyi, Richárd Földi, Rudolf Gesztelyi, Gábor Kardos, Béla Juhász: *In vitro* and *vivo* efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*

2nd workshop Medical Mycology December 8-10. 2011, Vienna, Austria